

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE VETERINARIA



ESTUDIO DE LAS SEPTICEMIAS CAUSADAS POR
***Pasteurella multocida* EN EL GANADO PORCINO Y BOVINO**

**Tesis presentada por la Licenciada en Veterinaria Dña. María Inmaculada
Cuevas Gómez para optar al Grado de Doctor en Veterinaria por la
Universidad de Córdoba**

**Departamento de Sanidad Animal
Córdoba, 2020**

TITULO: *ESTUDIO DE LAS SEPTICEMIAS CAUSADAS POR PASTEURELLA
MULTOCIDA EN EL GANADO PORCINO Y BOVINO*

AUTOR: *María Inmaculada Cuevas Gómez*

© Edita: UCOPress. 2020
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

ESTUDIO DE LAS SEPTICEMIAS CAUSADAS POR
***Pasteurella multocida* EN EL GANADO PORCINO Y BOVINO**

María Inmaculada Cuevas Gómez

Tesis Doctoral

Córdoba, 2020



TÍTULO DE LA TESIS:

“ESTUDIO DE LAS SEPTICEMIAS CAUSADAS POR *Pasteurella multocida* EN EL GANADO PORCINO Y BOVINO”

DOCTORANDO/A:

Dña. Inmaculada Cuevas Gómez

INFORME RAZONADO DE LA DIRECTORA DE LA TESIS

La Tesis Doctoral titulada “Estudio de las septicemias causadas por *Pasteurella multocida* en el ganado porcino y bovino”, realizada por Dña. Inmaculada Cuevas Gómez dio comienzo en el curso académico 2014-2015.

Durante este periodo, la doctoranda ha compatibilizado la elaboración de la tesis con su actividad profesional, como asesora veterinaria en ganado porcino y fundamentalmente en bovino. Su entusiasmo y la inquietud por la investigación la llevó en 2019 a solicitar una beca en Teagasc (the Agriculture and Food Development Authority), Irlanda, donde actualmente se encuentra trabajando en el proyecto: “Characterization of the microbiome and virome associated with the development of bovine respiratory disease in dairy and beef calves”.

A lo largo de este tiempo, se han realizado dos publicaciones indexadas en el *Journal of Citation Report* y un capítulo de libro editado por Elsevier:

-**Cuevas I.**, Carbonero A., Cano D., Pacheco I.L., Marín J.C., Borge C. “First outbreak of bovine haemorrhagic septicaemia caused by *Pasteurella multocida* type B in Spain – Short communication”. *Acta Veterinaria Hungarica*. 2020 May 4. doi: 10.1556/004.2020.00014. Online ahead of print.

-**Cuevas I.**, Carbonero A., Cano D., García-Bocanegra I., Amaro M.A., Borge C. “Antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* type B strains associated with acute septicemic processes in pigs and cattle in Spain” (2020). *BMC Vet Res*. 2020 Jun 30;16(1):222. doi: 10.1186/s12917-020-02442-z.

-Borge C., **Cuevas I.**, Arenas A., Carbonero A. “Pasteurellosis. Septicemia hemorrágica bovina” (2019). *Enfermedades Infecciosas y Parasitarias en el Ruminante*. Elsevier, (pp. 71-82). ISBN: 9788491133537

Además, se han presentado diferentes publicaciones en congresos de ámbito internacional, así como en revistas de difusión nacional.

La Tesis tiene como profundizar en el conocimiento de los aislados de *Pasteurella multocida* tipo B procedentes de brotes en porcino y bovino descritos en nuestro país y

exóticos en el resto de Europa, estableciendo de esta forma, las bases para su control. Para ello, se han analizado las características patológicas del proceso en ambas especies y se han estudiado los aislados procedentes de estos brotes. Se han llevado a cabo estudios bioquímicos y moleculares para la identificación de la especie, serotipos y biovares involucrados. Se han determinado los factores de virulencia presentes en estos aislados y se ha establecido el perfil de sensibilidad antibiótica a diferentes antimicrobianos.

La doctoranda ha realizado un trabajo de elevada calidad científica, avalado por las publicaciones presentadas tanto en revistas nacionales como internacionales, así como en comunicaciones a congresos, reuniendo, a mi juicio, los méritos para optar al Grado de Doctor.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 14 de julio de 2020

Firma de la directora

Fdo.:Carmen Borge Rodríguez

Así como la investigación parte de la curiosidad, esta investigación
la dedico a los que hoy tienen esa curiosidad inocente,
para que nunca la pierdan en este camino de aprendizaje.

A MARTINA, ELIAS Y OLIVIA

ÍNDICE

Capítulo I	9
Introducción	11
Capítulo II	53
Objetivos	55
Capítulo III	57
Estudio 1,Objetivos 1, 2 y 3	59
“Descripción de los brotes de septicemia hemorrágica por <i>Pasteurella multocida</i> tipo B en cerdos criados en extensivo en España”	
Estudio 2, Objetivos 1, 2 y 3	85
“First outbreak of bovine Haemorrhagic Septicaemia caused by <i>Pasteurella multocida</i> type B in Spain”.	
Estudio 3, Objetivo 4	99
“Virulence associated genes in type B <i>Pasteurella multocida</i> isolates from free-range swine and cattle in Spain”.	
Estudio 4, Objetivo 3	125
“Optimización en la aplicación de la espectometría de masas Maldi-Tof para la identificación de microorganismos patógenos”.	
Estudio 5, Objetivo 5	159
“Antimicrobial resistance of <i>Pasteurella multocida</i> type B isolates associated with acute septicemia in pigs and cattle in Spain”.	
Capítulo IV	191
Conclusiones	193
Capítulo V	197
Resumen	199
Capítulo VI	203
Indicios de calidad	205
Capítulo VII	209
Otras aportaciones científicas	211
Capítulo VIII	215
Listado de abreviaturas	217
Capítulo IX	219
Agradecimientos	

Capítulo I

Introducción

Durante los últimos años, el sector porcino español ha crecido notablemente tanto en producción, como en censos y en número de explotaciones, debido fundamentalmente al empuje de los mercados exteriores y a su competitividad en el mercado mundial (MAPA, 2019).

Actualmente, España es el segundo país de la Unión Europea (UE) en cuanto a volumen de producción de carne de porcino y la cuarta potencia productora mundial, después de China, Estados Unidos y Alemania, con un valor económico de la producción superior a los 6.000 millones de euros. Se trata del sector más importante de nuestra ganadería, representando el 36,8% de la producción final ganadera y el 14,4% de la producción final agraria (MAPA, 2019).

Además, nuestro país es el segundo mayor exportador de porcino de la UE, comercializando prácticamente el cincuenta por ciento de la producción fuera de nuestras fronteras. La propagación de la peste porcina africana (PPA) en China desde el verano de 2018, aumentó la demanda de carne de cerdo de la UE y a su vez, la demanda de lechones para engorde (MAPA, 2019).

Tras el porcino y la avicultura, en nuestro país destaca la producción de ganado vacuno, que ocupa el 5,9 por ciento de la Producción de la Rama Agraria de España. Con más de 150.000 empleos directos, un peso del 17,5 por ciento de la producción final ganadera y siendo quinto en Europa en censo de ganado vacuno y en producción de carne en 2018, el sector de vacuno de carne generó en España un valor de 3.363 millones de euros (MAPA, 2019).

Hasta el primer trimestre de 2020, las condiciones de mercado eran excepcionalmente buenas para el sector porcino, con unas estimaciones de sacrificio de 259,7 millones de cabezas en la UE. Nadie había imaginado, hace sólo unos meses, un escenario a nivel mundial como el provocado por la crisis del COVID-19. El mayor riesgo que planeaba sobre el sector era la Peste Porcina Africana, pero la nueva pandemia del COVID-19 ha colocado el presente del sector porcino en un escenario inesperado y muy negativo.

El COVID-19 ha irrumpido con fuerza y el confinamiento ha cambiado radicalmente los hábitos de consumo. Todos los productos cárnicos que se consumían por la vía de la restauración, el llamado sector HORECA (hoteles, restaurantes y cafeterías) han tenido una bajada de consumo radical, hundiendo los precios de los productos que se comercializaban por esta vía. Esto ha impactado especialmente al sector de la carne de vacuno, de ovino, a los productos del ibérico y a determinados segmentos del cerdo blanco, como el cochinillo, cuyo principal destino es la hostelería (Magallón E., 2020).

Las medidas para prevenir la propagación del coronavirus (distancia entre trabajadores), junto con una mayor tasa de bajas laborales (aunque bastante limitada), han llevado a ponerle límites a la capacidad de matanza y a forzar una lenta pero progresiva ralentización de las cadenas de matanza en todas las plantas europeas. Además, el paralelo desplome de los precios de la carne ha desincentivado también el interés del matadero por sacrificar más cerdos cuando el destino de su carne es el competido mercado exterior (América muy barata), el limitado mercado europeo (cierre de la restauración) o la congelación (a

precios todavía altos). Todo ello ha movido los precios del cerdo a la baja de forma clara, con descenso en torno al -8% en los principales países productores (Interporc, 2020).

En un mundo cada vez más global, las enfermedades serán cada vez más universales por el mayor movimiento de personas y mercancías, incluyendo en este apartado a los alimentos, lo que favorecerá que las enfermedades tengan mayor facilidad de expandirse por el conjunto del planeta. Por eso, la bioseguridad cobra importancia en sentido amplio y global, no solo a nivel de granja, sino como el conjunto de medidas encaminadas a impedir que nuevos agentes patógenos entren en nuestro país. Mantener una posición de liderazgo del sector porcino español implica hacer frente a unos retos basados en la bioseguridad y la sostenibilidad económica y ambiental (Magallón E., 2020).

La Septicemia Hemorrágica (SH) es un proceso sistémico que se presenta de forma hiperaguda principalmente en el ganado bovino doméstico y en los búfalos. Esta enfermedad, en la que principalmente intervienen los serogrupos B y E de *Pasteurella multocida* (De Alwis, 1992), es de declaración obligatoria estando incluida en la lista de infecciones e infestaciones de la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE), en vigor en 2019.

La enfermedad fue descrita por primera vez en 1880 en Malasia y desde entonces ha sido notificada en todos los continentes a excepción de Oceanía. Es endémica en ganado bovino y búfalos en numerosos países asiáticos y africanos, en los que su presencia causa importantes pérdidas económicas (OIE, 2013). Aunque la SH es una enfermedad poco frecuente en ganado porcino, se

han detectado brotes esporádicos en limitadas áreas geográficas del continente asiático, como India (Verma, 1988), Sri Lanka (Gamage et al., 1995) o Vietnam (Townsend et al., 1998b).

En zonas endémicas, la SH se considera la enfermedad bacteriana transmisible más importante que afecta a los bóvidos, siendo el sudeste asiático el área con la mayor incidencia. Países como Bután, China, India, Indonesia, Mongolia, Myanmar, Filipinas, Malasia o Sri Lanka son territorios endémicos. Teniendo en cuenta que Asia alberga el treinta por ciento de la población mundial de vacas y el 95 por ciento de los búfalos, la población susceptible en estas especies se aproxima a los 432 millones de vacas y 146 millones de búfalos; grandes poblaciones para unas infraestructuras y unos servicios veterinarios muy limitados. Las pérdidas económicas en África son menores a las que se producen en Asia debido al menor porcentaje de especies susceptibles a la enfermedad en este continente (Benkirane and De Alwis, 2002; Singh et al., 2014; Govindaraj et al., 2017).

A las pérdidas directas, causadas por la mortalidad, hay que añadir las pérdidas indirectas, relacionadas con la producción (carne, leche, índice de conversión, fallos reproductivos, pérdida de energía, etc.). En India, se estima que las pérdidas directas suponen un 80,3 por ciento, mientras que las indirectas un 19,7 por ciento. Algunos estudios muestran que en Pakistán el 34,4 por ciento de las muertes de ganado susceptible son debidas a la SH o que en India, en las últimas décadas, esta enfermedad ha supuesto entre el 46 y el 55 por ciento de todas las muertes bovinas. Las pérdidas económicas anuales se sitúan

alrededor de los 312 millones de euros en Pakistán o 779 millones de euros en India (Benkirane and De Alwis, 2002; Singh et al., 2014; Govindaraj et al., 2017).

En Europa y América la SH es un proceso poco frecuente, describiéndose solamente algunos brotes de forma esporádica que generalmente afectan a otras especies como el ganado porcino (OIE, 2013). En América del Norte esta enfermedad apareció en un parque natural de Estados Unidos en bisontes en 1912, 1922 y 1965-67. Posteriormente y de forma esporádica, se han descrito brotes en vacuno de leche y terneros en diferentes puntos del norte del continente. Sin embargo, la SH no se ha convertido en una enfermedad endémica en Norte América (Franson and Smith, 1988; De Alwis, 1999; Shivachandra et al., 2011).

En Europa, se han manifestado varios brotes de SH en los últimos años, afectando a ganado porcino, bovino y ungulados silvestres en Hungría o Alemania (Soike et al., 2012; Volker et al., 2014; Ujvári et al., 2015; Magyar et al., 2017). Así mismo, en España, el primer brote de pasteurellosis septicémica aguda causado por *P. multocida* tipo B fue detectado en 2009 en siete granjas de porcino ibérico criado en extensivo (Borge et al., 2011). Desde entonces se han producido brotes de SH de forma periódica en porcino (Cardoso-Toset et al., 2013), jabalíes (Risco et al., 2013) y el primer caso en bovino (Cuevas et al., 2016.) en sistemas extensivos de España.

Pasteurella multocida es una especie bacteriana que pertenece a la familia *Pasteurellaceae*, incluida dentro del orden *Pasteurellales*. Esta familia comprende 13 géneros, de los que *Pasteurella* es el género tipo e incluye un

amplio y variado grupo de bacterias Gram-negativas, que además de ser comensales en humanos y animales, pueden actuar de forma patógena (Christensen and Bisgaard, 2010; Wilson and Ho, 2013). *P. multocida* es la especie tipo de las 20 especies que componen este género (List of Prokaryotic names with Standing Nomenclature). Pertenecientes a esta especie tipo se clasifican fenotípicamente tres subespecies (*multocida*, *gallicida*, *septica*), en base a diferentes patrones de degradación del dulcitol y el sorbitol (Mutters et al., 1985). La subespecie más frecuente en todos los hospedadores es *P. multocida* subs *multocida* (García, 2010.).

Esta bacteria Gram negativa tiene forma de coco o de bacilo corto. Es un microorganismo anaerobio facultativo, inmóvil, capsulado y que no forma esporos. El crecimiento más eficiente de las especies pertenecientes al género *Pasteurella* se produce en agar sangre, dando lugar a colonias redondeadas, de aspecto mucoso y color grisáceo. *P. multocida* es una bacteria catalasa y oxidasa positiva que no produce hemólisis. Además, de las tres subespecies existentes, esta compleja especie se divide en cinco serogrupos o tipos capsulares (A, B, D, E y F), 13 biovares (1-10 y 12-14) y 16 serotipos o serovares (1-16), en base a la composición del lipopolisacárido (LPS) (Rimler and Glisson, 1997; Christensen and Bisgaard, 2000). En la actualidad, se combinan los métodos de fenotipado y genotipado para la realizar una tipificación completa de los aislados de *P. multocida* con el objetivo de estudiar sus características epidemiológicas.

El **aislamiento** se puede realizar mediante cultivo en agar sangre, agar chocolate o agar caseína/sacarosa/hongo, con un cinco por ciento de sangre, y posterior incubación durante 24 h a 37 °C (CFSPH, 2009). Tras el aislamiento, se realiza una identificación presuntiva inicial mediante las características morfológicas de las colonias (de 1 mm de diámetro aproximadamente, no hemolíticas, grisáceas, traslúcidas y brillantes) y la tinción de Gram, en la que observaremos cocobacilos Gram negativos de forma ovoide y con tinción bipolar (Blackall and Miflin, 2000)

Existe una gran variedad de **técnicas bioquímicas**, pero no se consideran un método preciso para la identificación de *P. multocida* debido a la heterogeneidad de esta especie. Normalmente estas técnicas se emplean para la determinación de las subespecies y biovares de este microorganismo. Sin embargo, algunos métodos bioquímicos pueden apoyar la identificación presuntiva inicial, de forma que *P. multocida* es catalasa y oxidasa positiva y su crecimiento en agar McConkey resulta negativo. Para la identificación bioquímica también existen kit comerciales de identificación semiautomática, denominados sistemas API (Biomerieux). Para la identificación de cepas pertenecientes a la familia Pasteurellaceae está indicado el API 20NE, pero su uso es limitado debido a su elevado coste y la controversia en sus resultados (Dziva et al., 2008).

La clasificación en las 3 **subespecies** de *P. multocida* se realiza en base a los patrones de fermentación del dulcitol y el sorbitol (Mutters et al., 1985) como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación fenotípica de las subespecies de *P. multocida*

Subespecie	Dulcitol	Sorbitol
<i>P. multocida</i> . subs <i>P. multocida</i>	-	+
<i>P. multocida</i> . subsp. <i>gallicida</i>	+	-
<i>P. multocida</i> . subsp. <i>septica</i>	-	+

La diferenciación de los 13 **biovares** se realiza mediante un patrón bioquímico (Tabla 2) que incluye la producción de ureasa, la presencia de ornitina descarboxilasa (ODC) y la degradación de 7 azúcares: glucosa, trehalosa, xylosa, dulcitol, sorbitol, lactosa y manitol (Fegan et al., 1995; Blackall et al., 1997).

Tabla 2. Perfil bioquímico de los biovares de *P. multocida*

Biovar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	13	14
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC ^a	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Fermentación:													
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Maltosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Trehalosa	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-
Xylosa	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+

^a ODC: Ornitina descarboxilasa.

Los **serotipos** somáticos de *P. multocida* se diferencian mediante precipitación en agar utilizando el esquema de Heddlestone (Heddlestone et al., 1972). En la actualidad no es una técnica muy utilizada por las dificultades que presenta en esta especie bacteriana debido a las reacciones cruzadas y la

influencia del tipo de cápsula (García, 2010.). Por lo tanto, para los estudios epidemiológicos es más frecuente la detección del tipo capsular (Dziva et al., 2008).

Mediante las **técnicas serológicas** se pueden detectar los antígenos capsulares y somáticos, que nos permiten determinar el serogrupo y el serotipo, respectivamente. Para identificación del tipo capsular, la técnica más popular hasta la aparición de las técnicas moleculares fue la prueba de la inhibición de la hemaglutinación (IHA) (Rhoades and Rimler, 1987), actualmente sustituida por la PCR múltiple desarrollada por Townsend y colaboradores en 2001. La prueba de precipitación en gel agar (Heddlestone et al., 1972) es la utilizada para la detección de los antígenos somáticos.

Las **técnicas moleculares** son necesarias para completar la identificación del microorganismo y su tipificación, proporcionando un diagnóstico rápido y específico. La técnica más utilizada por presentar la mayor sensibilidad y especificidad para la identificación de la especie *P. multocida* es la PCR desarrollada por Townsend y colaboradores en 1998. Esta PCR específica de **especie** identifica una secuencia de ADN única de *P. multocida* y la amplifica para dar lugar a un producto de 460 pares de bases (pb). Estos mismos autores desarrollaron en 2001 una PCR múltiple que permite una tipificación rápida y específica de los tipos capsulares de este microorganismo (A, B, D, E, F) permitiendo diferenciarlos todos en la misma reacción con una elevada sensibilidad y especificidad.

Adicionalmente, se han desarrollado PCRs específicas para la detección de las cepas causantes de la SH (Brickell et al., 1998; Townsend et al., 1998a). Sin embargo, estas últimas detectan solamente algunos serotipos específicos que se corresponden con los aislados más frecuentes en Asia. Posteriormente se desarrolló una PCR a tiempo real (HS-est-RT-PCR) con el mismo fin (Petersen et al., 2014) pero, aunque es más precisa que las previamente desarrolladas, son necesarias otras técnicas complementarias como *Multi-locus Sequence Typing* (MLST) así como técnicas serológicas para su verificación.

A raíz de la secuenciación del genoma completo de *P. multocida* en 2001 (May et al., 2001) se descubrió que una parte importante de dicho genoma estaba destinado a la producción de factores de virulencia (Boyce et al., 2012). Aunque se han intentado asociar estos genes al tipo capsular, biovar, hospedador o cuadro clínico, actualmente solo está clara la asociación del gen que da lugar a la toxina dermonecrótica con el tipo capsular D y los procesos clínicos de rinitis atrófica progresiva en porcino (Ewers et al., 2006).

La detección de los **factores de virulencia** de *P. multocida* mediante diversas PCRs también se utiliza para la caracterización de los aislados (Ewers et al., 2006). Además, varios estudios han identificado algunos de estos factores de virulencia como antígenos que confieren inmunidad, convirtiéndolos en candidatos ideales para el desarrollo de vacunas (Wheeler, 2009). Entre los factores relacionados con la virulencia de *P. multocida* destacan:

Cápsula

Como se ha indicado anteriormente, *P. multocida* presenta cinco tipos capsulares (A, B, D, E, F). La cápsula está compuesta en su mayor parte por polisacáridos y en algunos casos puede asociarse a lipoproteínas. El principal polisacárido que conforma la cápsula de serogrupo A es el ácido hialurónico. En el caso del tipo capsular B, en la composición del polisacárido predominan manosa, arabinosa y galactosa. La cápsula del tipo D incluye heparina o sulfato de heparina y la del tipo F incluye condroitina (Boyce and Adler, 2000; Shivachandra et al., 2011; Wilson and Ho, 2013). Esta estructura juega un papel fundamental en la colonización ya que inhibe la fagocitosis y la lisis mediada por el complemento. Las cepas con cápsula son más virulentas que aquellas sin cápsula (Boyce and Adler, 2000; Harper et al., 2006).

Proteínas de exterior de membrana

Las proteínas de exterior de membrana (OMP, *Outer Membran Proteins*) están presentes en muchas bacterias Gram negativas y participan en las interacciones patógeno-hospedador. Desempeñan un papel directo en la adhesión, uniéndose a la matriz proteica extracelular del hospedador. Muchas de ellas forman canales transmembrana que permiten el transporte de moléculas y, además, algunas tienen capacidad inmunógena (Lin et al., 2002; Wilson and Ho, 2013). Algunas de las OMP más estudiadas son: **OmpH**, **OmpA**, **Oma87**, **Psl**, **Pm1069** (Harper et al., 2006; Wilson and Ho, 2013). También son OMP las relacionadas con el transporte del hierro, llamadas IROMP (*iron-regulated OMP*), como son **TbpA**, **HgbA** o el receptor **TonB** (Shivachandra et al., 2011) que

veremos a continuación en el apartado de proteínas que intervienen en el transporte y metabolismo del hierro.

Fimbrias y adhesinas

En el genoma de *P. multocida* existen una gran variedad de genes que codifican proteínas similares a las fimbrias en otras bacterias. Algunos de ellos son: *ptfA*, *pfhA*, *fimA*, *flp1*, *flp2*, *hsf_1* o *hsf_2*. La mutación de los genes que codifican adhesinas da lugar a una reducción significativa de la virulencia en ratones (May et al., 2001). La fimbria tipo 4 (pili) o **PtfA** es similar a las fimbrias que en otras bacterias se han asociado con la virulencia ya que intervienen en la adhesión a la superficie de las células del hospedador (Harper et al., 2006). Sin embargo, su papel en *P. multocida* todavía no está claro (Wilson and Ho, 2013). Otro factor de virulencia es la hemaglutinina filamentosa **PfhA**, codificada por el gen *pfhA*. Este gen es similar a los que codifican hemaglutinina filamentosa en *Bordetella pertussis* y que interviene en la colonización del tracto respiratorio superior (Harper et al., 2006). PfhA aparentemente incrementa la dispersión y colonización de *P. multocida* (Fuller et al., 2000). Además, la presencia del gen *pfhA* en bóvidos ha sido relacionada con el cuadro clínico de la septicemia hemorrágica (Ewers et al., 2006).

Sialidasas

Las sialidasas son producidas por algunas especies bacterianas y actúan recogiendo el ácido siálico de diferentes compuestos del hospedador para utilizarlo como fuente de carbono y emplearlo en la sialilación de componentes

celulares. Además, reducen la efectividad de las defensas del hospedador, como la mucina (Mizan et al., 2000; Harper et al., 2006). En *P. multocida* aislada de cólera aviar se caracterizaron dos sialidasas, **NanH** y **NanB**, y se sugirió que la presencia de las dos proteínas mejora la capacidad metabólica de *P. multocida* en el hospedador (Mizan et al., 2000). Además, en el genoma de *P. multocida* se han identificado dos genes, *pm0188* y *pm0508*, que codifican transferasas del ácido siálico (Harper et al., 2006). No obstante, su papel en la virulencia de *P. multocida* no se ha demostrado.

Superóxido dismutasas: SodA, SodC

Los genes *sodA* y *sodC* codifican las dos proteínas superóxido dismutasas, **SodA** y **SodC**, respectivamente. Estas actúan protegiendo a la bacteria de los radicales libres de oxígeno generados por los macrófagos y neutrófilos del hospedador, permitiendo el desarrollo de la enfermedad (Verma et al., 2013).

Proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro

Debido a su toxicidad, el hierro en su forma libre disponible in vivo es muy limitado, por lo que suele encontrarse unido a diferentes proteínas. Por otra parte, el hierro es un componente esencial para la supervivencia de *P. multocida*, de manera que este microorganismo dispone de varios mecanismos para su adquisición (Harper et al., 2006).

Existen dos **proteínas de unión a la transferrina** (TbpA y TbpB) en las especies bacterianas pertenecientes a las familias Pasteurellaceae y Neisseriaceae. Estas proteínas intervienen en el transporte de hierro a través de

la membrana externa de la bacteria y dicha función es dependiente de la energía proporcionada por el sistema TonB. En *P. multocida* solo se ha evidenciado la presencia de una de estas dos proteínas, **TbpA**, codificada por el gen *tbpA* (Ogunnariwo and Schryvers, 2001). Sin embargo, esta proteína no se aísla en todas las cepas de *P. multocida*, estando presente solo en aquellas del tipo capsular B procedentes de muestras clínicas de rumiantes, hallazgo que ha dado lugar a especulación sobre su papel en la patogénesis de la septicemia hemorrágica (Ewers et al., 2006). En posteriores estudios relativos a la caracterización de cepas de los tipos capsulares A y D en porcino, no se ha evidenciado la presencia de este gen (Vera-Lizarazo, 2009; García, 2010).

Las **proteínas de unión a la hemoglobina, HgbA y HgbB**, desempeñan un papel importante en la supervivencia y crecimiento de *P. multocida* pero no intervienen directamente en su virulencia (Bosch et al., 2002b). Estas proteínas se unen a la hemoglobina utilizando el grupo hemo como fuente de hierro. (Cox et al., 2003).

El **sistema TonB** está formado por las proteínas que codifican los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* y aporta la energía necesaria para el transporte del hierro mediante su translocación a través de la membrana (Bosch et al., 2002a).

Toxina dermonecrótica (PMT, *Pasteurella multocida* toxin): ToxA

La PMT es la única toxina identificada de *P. multocida*. Principalmente la expresan las cepas del serogrupo D y en menor medida, las del tipo A. Solo las cepas que la contienen (toxigénicas) dan lugar a la atrofia de los cornetes

nasales (Rutter, 1985) por lo que es la causante de la patología y de la clínica de la rinitis atrófica progresiva (RAP), característica del porcino. Se ha demostrado que la PMT actúa como un inmunógeno efectivo en inoculaciones en ratones, siendo utilizado su toxoide (PMT genéticamente modificada), en el control de la RAP en el ganado porcino. (Petersen et al., 1991).

La secuenciación del genoma completo de *P. multocida* abrió un campo extraordinario de posibilidades de investigación pero, a pesar de los progresos en el desarrollo de técnicas moleculares en los últimos años, escasamente se han relacionado genes específicos con hospedadores o enfermedades, continuando las incógnitas que rodean a este versátil patógeno (Boyce et al., 2012).

En este sentido, para la caracterización del microorganismo, además de las técnicas mencionadas, existe una gran variedad de métodos moleculares con especificidad y poder de discriminación variables como: Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD); Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP); Repetitive Extragenic Palindromic PCR (REP-PCR); Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP); Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE); Multi-locus Sequence Typing (MLST); Restriction Enzyme Analysis (REA); análisis de restricción de plásmidos o el ribotipado (Blackall and Mifflin, 2000; Dziva et al., 2008).

Desde que Louis Pasteur descubrió en 1880 el microorganismo *P. multocida* como agente causal del cólera aviar (Pasteur, 1880), este patógeno ha

sido reconocido como agente causal de numerosas enfermedades que afectan a mamíferos, aves y humanos.

Pasteurella multocida se localiza principalmente en el tracto respiratorio superior de animales domésticos y salvajes. A pesar de considerarse como un patógeno oportunista, es el agente primario de numerosas enfermedades de importancia económica en todo el mundo que afectan a un amplio rango de hospedadores domésticos y salvajes. Estos procesos pueden variar desde infecciones progresivas como la rinitis atrófica progresiva (RAP) a septicémicas agudas como el cólera aviar o la SH. Los portadores sanos son comunes a todas las infecciones causadas por *P. multocida*, siendo muy importantes desde el punto de vista epidemiológico (Harper et al., 2006; Dziva et al., 2008).

Los procesos predominantes en infecciones endémicas o epizooticas producidos por *P. multocida* son los trastornos respiratorios. En ellos pueden verse involucradas las vías respiratorias superiores, en forma de rinitis, o las vías respiratorias inferiores, en forma de neumonía (Wilson and Ho, 2013).

Pasteurellosis neumónica

Pasteurella multocida puede actuar como agente primario o secundario en los procesos neumónicos de bovino, porcino, pequeños rumiantes y conejos (Harper et al., 2006; Dziva et al., 2008). Además, juega un papel importante en el incremento de la gravedad de las infecciones primarias en los pulmones de cerdos y rumiantes causadas por otros patógenos (Dziva et al., 2008).

Las lesiones que *P. multocida* causa en los procesos respiratorios no son patognomónicas, por lo que es necesario conocer las características del brote, la histopatología así como el aislamiento e identificación del patógeno para confirmar el diagnóstico presuntivo (Pijoan, 2006). *P. multocida* es uno de los principales microorganismos involucrados en el síndrome respiratorio bovino (SRB), complejo respiratorio porcino (CRP), pasteurelosis neumónica en ovino y pasteurelosis en los conejos, procesos que causan importantes pérdidas económicas (Harper et al., 2006; Pijoan, 2006; Dabo et al., 2007). El serogrupo más aislado en los procesos neumónicos es el tipo A, apareciendo con menor frecuencia el tipo capsular D (Ewers et al., 2006; Pors et al., 2011), mientras que raramente están implicados los serogrupos B, E o F (Davies et al., 2003; Bethe et al., 2009). Generalmente, el desarrollo de la pasteurelosis neumónica depende de la coinfección por otras bacterias y/o virus además de otros factores que inmunodeprimen al animal como las condiciones ambientales, el estrés o el estatus sanitario del animal (Ross, 2006; Dabo et al., 2007). A diferencia de la SH, en este tipo de pasteurelosis las principales lesiones aparecen en los pulmones y consisten en una bronconeumonía variable (necrotizante, fibrinosa o supurativa) que puede o no tener una pleuritis asociada (Praveena et al., 2014).

Rinitis Atrófica Progresiva

La pasteurelosis que afecta principalmente a las vías respiratorias superiores de forma crónica se denomina RAP, enfermedad muy contagiosa que afecta principalmente al porcino, causando importantes pérdidas económicas en la cría intensiva de esta especie (Magyar and Lax, 2002). Los animales

afectados raramente mueren, por lo que las pérdidas económicas son debidas a la disminución de la tasa de crecimiento (Harper et al., 2006). La principal manifestación clínica de la RAP es la torsión del hocico debido a una reabsorción ósea que da lugar a la atrofia de los huesos del cornete nasal. (Pedersen and Elling, 1984; Magyar and Lax, 2002; Wilson and Ho, 2013). Solo las cepas toxigénicas de *P. multocida* son las causantes de esta sintomatología. Además, únicamente el tipo capsular D está asociado a esta enfermedad (Davies et al., 2003). Para que se produzca la colonización del tracto respiratorio superior por *P. multocida* en la RAP, debe producirse un daño previo en la mucosa nasal. Este daño puede estar causado por otras bacterias como *Bordetella Bronchiseptica* o irritantes químicos (Magyar and Lax, 2002). Actualmente se vacuna rutinariamente en granjas intensivas con historial de RAP. Esta enfermedad puede ser erradicada mediante vacunación, detección y eliminación de portadores así como llevando a cabo medidas de manejo y profilaxis (García, 2010).

Cólera aviar

El cólera aviar es una enfermedad severa que afecta tanto a aves domésticas como salvajes y que causa importantes pérdidas económicas a nivel mundial (Christensen and Bisgaard, 1997; Harper et al., 2006). Aunque principalmente se presenta como una enfermedad aguda, con altos porcentajes de morbilidad y mortalidad, también puede aparecer de forma crónica, con síntomas clínicos y lesiones relacionados con infecciones localizadas (Blackall et al., 1997; Blackall and Miflin, 2000). La mayoría de los casos están asociados al

tipo capsular A, habiéndose aislado de forma menos frecuente los serogrupos D, F o B (Christensen and Bisgaard, 1997). Es una enfermedad septicémica cuya puerta de entrada es el epitelio del tracto respiratorio. Los síntomas que muestran los animales afectados son: fiebre, anorexia, depresión, secreción mucosa a través de la boca, diarrea y aumento de la frecuencia respiratoria. La muerte es causada por una bacteriemia masiva seguida de shock endotóxico (Harper et al., 2006). El principal método de control de esta enfermedad es la realización de buenas prácticas sanitarias junto con medidas de bioseguridad efectivas. En áreas endémicas, donde el cólera aviar es un problema, se utilizan vacunas (Blackall and Mifflin, 2000). Actualmente en España esta enfermedad no supone un problema grave gracias a las medidas higiénico-sanitarias y terapéuticas implantadas (García, 2010).

Implicaciones en Salud Pública

Los casos de infección por *P. multocida* en humanos están principalmente asociados a mordeduras y arañazos de carnívoros o al contacto de secreciones procedentes de perros o gatos en abrasiones de la piel, causando inflamación en el lugar de la herida y/o abscesos (Dziva et al., 2008). La infección respiratoria en humanos es relativamente infrecuente pero puede producirse en pacientes con enfermedad pulmonar crónica (Wilson and Ho, 2013).

Septicemia Hemorrágica

La SH se produce tras la infección por los tipos capsulares B o E de *P. multocida*. Los principales serotipos asociados a esta enfermedad son el B:2

(asiático) y E:2 (africano) (sistema de Carter y Heddlestone), que se corresponden con los serotipos 6:B y 6:E (sistema Namioka-Carter), respectivamente (De Alwis, 1992; Kumar et al., 2004). Esporádicamente se han vinculado a la SH los serotipos A:1 y A:3 aislados en bovino y búfalo en la India (OIE, 2013). Así mismo, se han visto implicados los serotipos B:3,4, A:3,4, B:1 en procesos esporádicos de pasteurellosis septicémica en ciervos, difíciles de distinguir de la SH (CFSPH, 2009).

Las tasas de morbilidad y letalidad de esta enfermedad dependen de factores como el estado inmune de los animales, de las condiciones medioambientales y del manejo de los rebaños, entre otros.

Así, climas húmedos o periodos de fuertes lluvias favorecen la aparición de la SH debido a que el agente causal persiste mayor tiempo fuera del hospedador en presencia de humedad (Shivachandra et al., 2011). Sin embargo, se han descrito brotes en diferentes épocas del año, independientemente de la estación (Kumar et al., 2004).

También, el hospedador y la edad son factores que influyen en la letalidad, siendo más sensibles los búfalos y los animales más jóvenes (De Alwis, 1999). Así mismo, factores estresantes pueden aumentar la sensibilidad del animal a desarrollar la enfermedad (CFSPH, 2009).

Cuando la SH aparece en un área por primera vez, generalmente la morbilidad es alta, produciéndose brotes explosivos que pueden afectar entre un cincuenta y un cien por cien de los animales de la explotación. En áreas

endémicas, los brotes aparecen tras la introducción de portadores sanos en la explotación, en cuyo caso los animales adultos tienen algún grado de inmunidad y no se vuelven a producir brotes importantes, apareciendo los casos clínicos sólo entre los animales jóvenes. Si no se realiza un tratamiento temprano, la tasa de letalidad puede situarse en torno al cien por cien (De Alwis, 1999).

El contagio puede producirse por contacto directo o indirecto a través de la vía oronasal. La transmisión indirecta generalmente ocurre por inhalación y/o ingestión de materiales que han sido contaminados por animales infectados o portadores sanos que entran en contacto con un colectivo libre de SH. Si bien *P. multocida* no sobrevive fuera del animal durante largos periodos de tiempo, los ambientes húmedos, tejidos animales o pastos recién infectados pueden aumentar su supervivencia (Shivachandra et al., 2011).

En la mayoría de los procesos causados por *P. multocida*, el microorganismo actúa de forma secundaria o en combinación con otros agentes. Sin embargo, la SH es una pasteurelosis primaria. La entrada del patógeno se produce por la vía oronasal, desarrollándose la multiplicación inicial en las tonsilas. El periodo de incubación dura de 1 a 3 días. El éxito de la infección dependerá, por un lado, de los factores de virulencia del microorganismo y por otro, de los mecanismos de inmunidad específicos del hospedador, lo que dará lugar al cuadro clínico o a la aparición de un portador sano (De Alwis, 1999).

Si el sistema inmune del hospedador prevalece sobre el agente patógeno, el animal, con frecuencia, se convertirá en portador. El microorganismo se conserva generalmente en los tejidos linfáticos del tracto respiratorio superior de

los portadores, excretándose intermitentemente vía nasal (de Alwis et al., 1990). Recientemente se ha sugerido que, bajo condiciones de estrés, los portadores también pueden excretar el microorganismo a través de los tractos gastrointestinal y urinario (Annas et al., 2014).

La enfermedad se puede presentar de forma sobreaguda, aguda, subaguda o crónica. El curso de la SH puede variar desde la muerte súbita (forma sobreaguda) hasta un proceso que se prolonga unos cinco días, caracterizado por una fase inicial con fiebre (a menudo inaparente), una fase respiratoria y una fase terminal de septicemia con decúbito hasta la muerte (De Alwis, 1999; Shivachandra et al., 2011).

La **forma aguda** se caracteriza por un comienzo abrupto con fiebre (41-42 °C), letargia, respiración superficial y cianosis en las mucosas visibles que conducen a una fase terminal de septicemia y muerte dentro de las primeras 24 horas. Ocasionalmente, en la forma aguda también aparecen lagrimeo, descarga nasal, temblores musculares, dolor cólico leve o diarrea.

En la **forma subaguda** (conocida como edematosa subcutánea), el animal sobrevive durante 2-3 días y el signo más característico es la inflamación edematosa de la región submandibular que se propaga por el cuello hasta el pecho.

En la **forma crónica** aparecen signos de respiración corta, dolorosa y rápida con secreciones nasales muco-purulentas o sanguinolentas (Shivachandra et al., 2011; OIE, 2013).

La lesión más evidente en un animal que ha muerto a causa de la SH es el edema subcutáneo que se extiende desde la región submandibular hasta el pecho. Este edema puede variar desde una sustancia gelatinosa y amarillenta hasta un fluido serosanguinolento. También puede aparecer edema en la musculatura, en la cavidad torácica y abdominal, en el saco pericárdico o en las articulaciones.

Además de los edemas, son frecuentes las hemorragias petequiales o equimóticas generalizadas en distintas localizaciones, especialmente en las superficies serosas. Estas aparecen principalmente en los ganglios cervicales, en la zona de la faringe, en el corazón, en el tejido subcutáneo o en el músculo. Los pulmones aparecen edematosos y congestionados y el tracto intestinal puede presentar hiperemia y congestión con petequias y equimosis. En algunos casos hiperagudos estas lesiones no son manifiestas, apareciendo únicamente petequias dispersas (De Alwis, 1999; CFSPH, 2009; OIE, 2013).

El diagnóstico presuntivo se realiza con el hallazgo de los síntomas y lesiones típicos mencionados con anterioridad, tales como el edema submandibular, la presencia de congestión y hemorragias, así como por el historial del rebaño, los patrones de morbilidad y letalidad, la especie afectada y los rangos de edad de los animales enfermos (OIE, 2013).

En el ganado bovino, la SH debe ser diferenciada de otras enfermedades que presentan un cuadro clínico similar y que son prevalentes en el lugar donde aparece el brote. Por lo tanto, el diagnóstico diferencial se realiza con

enfermedades en las que se produce una muerte aguda. Así mismo, debemos tener en cuenta causas no infecciosas (Tabla 3).

Tabla 3. Diagnóstico diferencial de la septicemia hemorrágica bovina.

Enfermedades infecciosas	Agente etiológico
Carbunco sintomático	<i>Clostridium chavuoiei</i>
Carbunco bacteridiano	<i>Bacillus anthracis</i>
Salmonelosis aguda	<i>Clostridium septicum</i>
Edema maligno	<i>Salmonella spp.</i>
Peste bovina	Género <i>Morbillivirus</i>
Pasteurellosis neumónica	<i>Pasteurella multocida A, D</i> <i>Mannheimia haemolytica A1, A2</i>
Causas no infecciosas	
Intoxicación	
Mordedura de serpiente	

El cuadro clínico de la SH en el que aparece sintomatología respiratoria debe de ser diferenciado de la pasteurellosis neumónica (Tabla 4), también conocida en el ganado bovino como “fiebre del embarque”, proceso que forma parte del complejo de enfermedades respiratorias bovinas (SRB). Para ello, se debe tener en cuenta que la SH siempre termina en septicemia, mientras que en la pasteurellosis neumónica los síntomas y lesiones quedan restringidos al tracto respiratorio.

Tabla 4. Diferencias entre la septicemia hemorrágica y la pasteurelosis neumónica.

SEPTICEMIA HEMORRÁGICA	PASTEURELOSIS NEUMÓNICA
<i>P. multocida</i> tipos B, E	<i>P. multocida</i> tipos A, D <i>Mannheimia haemolytica</i> tipos A1, A2
Enfermedad primaria	Enfermedad secundaria a factores estresantes o enfermedades víricas
Proceso septicémico	Proceso respiratorio
Sintomatología respiratoria debida al edema submandibular	Lesiones en sistema respiratorio causan sintomatología respiratoria
Hemorragias sistémicas	Lesiones solo en sistema respiratorio

Para el diagnóstico laboratorial de la SH en animales vivos se necesitan muestras de sangre y de secreciones nasales, no obstante, no siempre será posible aislar *P. multocida* antes de la fase terminal. En el caso de animales muertos, las muestras indicadas son sangre del corazón o vísceras. Si no es posible obtener las muestras mencionadas frescas, se puede emplear para el cultivo médula ósea de huesos largos (De Alwis, 1992). El diagnóstico laboratorial se realiza mediante el aislamiento del agente causal, *P. multocida*, en cultivo puro y su posterior identificación mediante técnicas bioquímicas, serológicas o moleculares (OIE, 2013).

Para el tratamiento clínico de la SH, se ha estudiado la eficacia de numerosos antibióticos como: penicilina, amoxicilina (o ampicilina), ceftiofur, cefquinoma, estreptomina, gentamicina, espectinomicina, florfenicol, tetraciclinas, sulfonamidas, sulfametoxazol/trimetoprim, eritromicina, tilmicosina, enrofloxacin (u otras fluoroquinolonas), amikacina y norfloxacin

(OIE, 2013). Sin embargo, la antibioterapia únicamente es útil si se emplea inmediatamente después de la aparición de los signos clínicos. Su uso en la fase terminal de la enfermedad puede causar un shock endotóxico debido a la liberación de endotoxinas de las bacterias, acelerando la muerte del animal (De Alwis, 1999). Además, la terapia con antibióticos cada vez está más comprometida por el aumento de las resistencias bacterianas en las últimas décadas (Kumar et al., 2009).

La introducción de los antibióticos, en los años 30 del siglo XX, supuso una revolución en la medicina, convirtiéndose entonces en una de las intervenciones más importantes para el control de las enfermedades infecciosas. Los antibióticos han salvado la vida de millones de personas en todo el mundo y han permitido el avance de la medicina pero debido al uso masivo de estas sustancias, el fenómeno natural de mutación genética que da lugar a las resistencias bacterianas se ha disparado en las últimas décadas, provocando una preocupación creciente a nivel mundial (Alós, 2015).

Actualmente, la aparición y el aumento de bacterias resistentes a los antibióticos se ha convertido en uno de los desafíos globales más importantes para la salud pública, la seguridad alimentaria y el desarrollo. En la Unión Europea (UE) las muertes debidas a infecciones bacterias resistentes se sitúan en torno a 33.000 muertes anuales. La aparición de resistencias es un fenómeno natural, pero el uso indebido de antibióticos en humanos y animales está acelerando el proceso. Esta emergencia de bacterias resistentes se ha producido tanto en el ámbito hospitalario como en ganadería, acuicultura o

cultivos, por lo que se trata de un problema multisectorial que comprende la relación entre humanos, animales y medio ambiente. Por ello, es necesario abordar este reto de forma multidimensional bajo el concepto “*One Health*”, reconociendo que la salud de humanos, animales y ecosistema están interconectados (FAO, 2016, 2017; WHO, 2018).

En España, el 27 por ciento de los aislados de *P. multocida* procedentes de cerdos con neumonía estudiados entre 1987-1988 eran susceptibles a todos los antibióticos testados mientras que esa proporción se redujo al 10,6 por ciento entre los años 2003-2004. Para entonces, el 62 por ciento de las cepas eran multirresistentes (Lizarazo et al., 2006). Desde hace más de una década varios antibióticos resultan prácticamente inactivos frente a las cepas de *P. multocida* aisladas de porcino en España o muestran altos porcentajes de resistencia. Es el caso de la clindamicina, eritromicina o sulfamidas (Lizarazo et al., 2006; Petrocchi-Rilo et al., 2019). En una sola década la resistencia de *P. multocida* frente a las tetraciclinas aumentó de un 1,6 a un 14,6 por ciento y en el caso de las sulfamidas de un 13 a un 80 por ciento (Lizarazo et al., 2006).

En el resto del mundo también es creciente la aparición de resistencias antimicrobianas. En China, en un periodo de cuatro años (2003-2007) las cepas de *P. multocida* resistentes a más de siete agentes antimicrobianos pasaron de ser el 16,2 por ciento a incrementarse hasta el 62,8 por ciento (Tang et al., 2009; Oh et al., 2018).

Mundialmente se repiten los antibióticos frente a los que *P. multocida* muestra menor porcentaje de resistencias, destacando la enrofloxacin, el

ceftiofur y el florfenicol (Lizarazo et al., 2006; Tang et al., 2009; Sarangi et al., 2015; El Garch et al., 2016; Timsit et al., 2017; Oh et al., 2018; Petrocchi-Rilo et al., 2019). Sin embargo, tanto la enrofloxacin como el ceftiofur están clasificados por la “World Health Organization” (WHO) como “antibióticos de importancia crítica” para la salud humana dentro de la categoría de “máxima prioridad”, por lo que su uso debe de ser reservado como último recurso y siempre tras la comprobación de la susceptibilidad de las cepas bacterianas.

La única forma de prevenir la SH es combinando la inmunoprofilaxis con la profilaxis sanitaria (OIE, 2013). En áreas endémicas, la vacunación es un método de control más efectivo que la antibioterapia (Govindaraj et al., 2017).

Para controlar la SH principalmente se utilizan dos tipos de vacunas: inactivadas (bacterinas) y vivas atenuadas. Las **bacterinas** resultan de la inactivación del patógeno mediante procesos físicos (calor, radiación, UV) o químicos (formalina). Son seguras para el animal, pero confieren un periodo corto de inmunidad. Dependiendo del adyuvante, abarcan un periodo de actuación variable, de forma que las precipitadas con alumbre o en gel de hidróxido de aluminio proporcionan una inmunidad que dura entre 4 y 6 meses, mientras que las combinadas con un adyuvante oleoso confieren hasta 1 año de inmunidad. Las vacunas con adyuvante oleoso tienen algunos inconvenientes como la difícil administración debido a su viscosidad o la aparición de reacciones en la piel (Verma and Jaiswal, 1998). Generalmente, las bacterinas se utilizan en zonas endémicas reduciendo la incidencia de SH, pero, debido su corto periodo de protección, siguen apareciendo brotes. Las vacunas **vivas atenuadas** son

más eficaces que las inactivadas; además, confieren un periodo más largo de protección y pueden dar lugar a inmunidad cruzada frente a serotipos heterólogos. Sin embargo, son vacunas menos seguras que las bacterinas, pudiendo dar lugar a la enfermedad en animales sanos (Shivachandra et al., 2011). La única vacuna viva atenuada que se utiliza actualmente fue desarrollada en 1989 a partir de la cepa *P. multocida* B: 3,4 (Myint and Carter, 1989), se administra mediante aerosol intranasal y solo se usa en algunos países asiáticos, en el resto de países se utilizan vacunas inactivadas (OIE, 2013).

Desde que se puso en evidencia la elevada expresión de genes relacionados con la virulencia en el hospedador, independientemente del tipo capsular de *P. multocida*, los productos proteicos de estos genes como son OmpH, TbpA, PtfA, Oma87, se han convertido en candidatos ideales para la creación de vacunas recombinantes de subunidades que son seguras al no dar lugar al desarrollo de la enfermedad. Los recientes estudios van encaminados al desarrollo de este tipo de vacunas y su aplicación práctica (Shivachandra et al., 2015; Muangthai et al., 2018).

Existen tres situaciones, representadas en la Tabla 5, para las que se recomiendan distintas medidas de prevención frente a la SH (De Alwis, 1999; OIE, 2013).

Tabla 5. Medidas de prevención frente a la septicemia hemorrágica.

En zonas endémicas
<ul style="list-style-type: none"> • Vacunar en los 2 a 3 meses previos al momento de mayor riesgo • Establecer un buen sistema de notificación • Educar a los ganaderos para la detección precoz de la clínica • Evitar la mezcla de animales de zonas endémicas y no endémicas
Durante un brote
<ul style="list-style-type: none"> • Continuar los programas de vacunación • Aislar y tratar animales con signos clínicos con antibiótico vía parenteral • Comprobar temperatura rectal de animales en contacto diariamente • Detectar enfermos o cadáveres y eliminar éstos últimos mediante incineración • Limitar el movimiento de animales • Eliminar el forraje no consumido, la cama de los animales, etc.
Prevención en zonas libres
<ul style="list-style-type: none"> • Importar animales únicamente de áreas sin brotes al menos en un año • Chequear animales de forma aleatoria • Comprobar presencia de anticuerpos mediante IHA • Realizar cuarentenas antes y después del transporte de 2 o 3 semanas • Vacunar animales de zonas libres de enfermedad en países endémicos

Referencias

- Alós, J. I. 2015. Antibiotic Resistance: A global crisis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 33(10):639-702. doi: DOI: 10.1016/j.eimc.2014.10.004
- Annas, S., M. Zamri-Saad, F. F. Jesse, and Z. Zunita. 2014. New sites of localisation of *Pasteurella multocida* B:2 in buffalo surviving experimental haemorrhagic septicaemia. *BMC Vet Res* 10:88. doi: 10.1186/1746-6148-10-88
- Benkirane, A., and M. C. L. De Alwis. 2002. Haemorrhagic septicaemia, its significance, prevention and control in Asia. *Vet. Med.* 47:234-240.
- Bethe, A., L. H. Wieler, H. J. Selbitz, and C. Ewers. 2009. Genetic diversity of porcine *Pasteurella multocida* strains from the respiratory tract of healthy and diseased swine. *Veterinary Microbiology* 139(1-2):97-105. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.04.027
- Blackall, P. J., and J. K. Miflin. 2000. Identification and typing of *Pasteurella multocida*: a review. *Avian Pathol* 29(4):271-287. doi: 10.1080/03079450050118395
- Blackall, P. J., J. L. Pahoff, and R. Bowles. 1997. Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian pigs. *Veterinary Microbiology* 57(4):355-360. (Article) doi: 10.1016/s0378-1135(97)00111-9
- Borge, C., I. Barranco, J. M. Márquez del Cid, M. A. Rodríguez-Guerra, A. Carbonero, L. Carrasco, and A. Perea. 2011. Outbreak of acute septicaemia by *Pasteurella multocida* type B in pigs reared in extensive system in Spain. In: 3rd European Symposium of Porcine Health and Management (ESPHM). Espoo, Finland. p 127.
- Bosch, M., E. Garrido, M. Llagostera, A. M. P. de Rozas, I. Badiola, and J. Barbe. 2002a. *Pasteurella multocida* exbB, exbD and tonB genes are physically linked

but independently transcribed. Fems Microbiology Letters 210(2):201-208.
(Article) doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11181.x

Bosch, M., M. E. Garrido, M. Llagostera, A. M. P. de Rozas, I. Badiola, and J. Barbe. 2002b. Characterization of the *Pasteurella multocida* hgbA gene encoding a hemoglobin-binding protein. Infection and Immunity 70(11):5955-5964. (Article) doi: 10.1128/iai.70.11.5955-5964.2002

Boyce, J. D., and B. Adler. 2000. The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B : 2). Infection and Immunity 68(6):3463-3468. (Article) doi: 10.1128/iai.68.6.3463-3468.2000

Boyce, J. D., T. Seemann, B. Adler, and M. Harper. 2012. Pathogenomics of *Pasteurella multocida*. Curr Top Microbiol Immunol 361:23-38. doi: 10.1007/82_2012_203

Brickell, S. K., L. M. Thomas, K. A. Long, M. Panaccio, and P. R. Widders. 1998. Development of a PCR test based on a gene region associated with the pathogenicity of *Pasteurella multocida* serotype B:2, the causal agent of haemorrhagic septicaemia in Asia. Vet Microbiol 59(4):295-307.

Cardoso-Toset, F., J. Gomez-Laguna, M. Callejo, A. I. Vela, L. Carrasco, J. F. Fernandez-Garayzabal, A. Maldonado, and I. Luque. 2013. Septicaemic pasteurellosis in free-range pigs associated with an unusual biovar 13 of *Pasteurella multocidas*. Veterinary Microbiology 167(3-4):690-694. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.08.005

CFSPH. 2009. Septicemia Hemorrágica.
http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/hemorrhagic_septicemia-es.pdf.

- Christensen, H., and M. Bisgaard. 2010. Molecular classification and its impact on diagnostics and understanding the phylogeny and epidemiology of selected members of Pasteurellaceae of veterinary importance. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 123(1-2):20-30.
- Christensen, J. P., and M. Bisgaard. 1997. Avian pasteurellosis: Taxonomy of the organisms involved and aspects of pathogenesis. *Avian Pathol* 26(3):461-483. doi: 10.1080/03079459708419228
- Christensen, J. P., and M. Bisgaard. 2000. Fowl cholera. *Rev Sci Tech* 19(2):626-637.
- Cox, A. J., M. L. Hunt, J. D. Boyce, and B. Adler. 2003. Functional characterization of HgbB, a new hemoglobin binding protein of *Pasteurella multocida*. *Microbial Pathogenesis* 34(6):287-296. doi: 10.1016/s0882-4010(03)00062-7
- Cuevas, I., I. Pacheco, J. C. Marín, A. Carbonero, D. Cano, I. García-Bocanegra, and C. Borge. 2016. Brote de septicemia hemorrágica por *Pasteurella multocida* B:3 en una explotación de bovino extensivo. In: XII Congreso Internacional Anembe de Medicina Bovina., Santiago de Compostela, Spain.
- Dabo, S. M., J. D. Taylor, and A. W. Confer. 2007. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev* 8(2):129-150. doi: 10.1017/s1466252307001399
- Davies, R. L., R. MacCorquodale, S. Baillie, and B. Caffrey. 2003. Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. *Journal of Medical Microbiology* 52(1):59-67. doi: 10.1099/jmm.0.05019-0

- De Alwis, M. C. 1992. Haemorrhagic septicaemia--a general review. Br Vet J 148(2):99-112. doi: 10.1016/0007-1935(92)90101-6
- de Alwis, M. C., T. G. Wijewardana, A. I. Gomis, and A. A. Vipulasiri. 1990. Persistence of the carrier status in haemorrhagic septicaemia (*Pasteurella multocida* serotype 6:B infection) in buffaloes. Trop Anim Health Prod 22(3):185-194.
- De Alwis, M. C. L. 1999. Haemorrhagic Septicaemia No. 57, ACIAR Monograph.
- Dziva, F., A. P. Muhairwa, M. Bisgaard, and H. Christensen. 2008. Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with *Pasteurella multocida*. Vet Microbiol 128(1-2):1-22. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.10.018
- El Garch, F., A. de Jong, S. Simjee, H. Moyaert, U. Klein, C. Ludwig, H. Marion, S. Haag-Diergarten, A. Richard-Mazet, V. Thomas, and E. Siegwart. 2016. Monitoring of antimicrobial susceptibility of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe, 2009-2012: VetPath results. Vet Microbiol 194:11-22. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.04.009
- Ewers, C., A. Lubke-Becker, A. Bethe, S. Kiessling, M. Filter, and L. H. Wieler. 2006. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. Veterinary Microbiology 114(3-4):304-317. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.12.012
- FAO. 2016. The FAO Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016-2020. <http://www.fao.org/3/a-i5996e.pdf>.
- FAO. 2017. Antimicrobial resistance in food and agriculture. <http://www.fao.org/3/a-i7138e.pdf>.

- Fegan, N., P. J. Blackall, and J. L. Pahoff. 1995. Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian poultry. *Veterinary Microbiology* 47(3-4):281-286. (Article) doi: 10.1016/0378-1135(95)00119-0
- Franson, J. C., and B. L. Smith. 1988. Septicemic pasteurellosis in elk (*Cervus elaphus*) on the United States National Elk Refuge, Wyoming. *J Wildl Dis* 24(4):715-717. doi: 10.7589/0090-3558-24.4.715
- Fuller, T. E., M. J. Kennedy, and D. E. Lowery. 2000. Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis. *Microbial Pathogenesis* 29(1):25-38. (Article) doi: 10.1006/mpat.2000.0365
- Gamage, L. N. A., T. G. Wijewardana, H. L. G. Bastiansz, and A. A. Vipulasiri. 1995. An outbreak of acute pasteurellosis in swine caused by serotype B:2 in Sri Lanka. *Sri Lanka Veterinary Journal* 42:15-19.
- García, N. 2010. Caracterización fenotípica y genética de aislados de *Pasteurella multocida* obtenidos de ganado porcino., Universidad Complutense de Madrid.
- García, N. 2010. Caracterización fenotípica y genética de aislados de *Pasteurella multocida* obtenidos de ganado porcino., Universidad Complutense de Madrid.
- Govindaraj, G., P. Krishnamoorthy, K. R. Nethrayini, R. Shalini, and H. Rahman. 2017. Epidemiological features and financial loss due to clinically diagnosed Haemorrhagic Septicemia in bovines in Karnataka, India. *Prev Vet Med* 144:123-133. doi: 10.1016/j.prevetmed.2017.05.027

- Harper, M., J. D. Boyce, and B. Adler. 2006. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. FEMS Microbiol Lett 265(1):1-10. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00442.x
- Heddleston, K. L., J. E. Gallagher, and P. A. Rebers. 1972. Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteruella multocida* from avian species. Avian Dis 16(4):925-936.
- Kumar, A. A., S. B. Shivachandra, A. Biswas, V. P. Singh, and S. K. Srivastava. 2004. Prevalent serotypes of *Pasteurella multocida* isolated from different animal and avian species in India. Vet Res Commun 28(8):657-667.
- Kumar, P., V. P. Singh, R. K. Agrawal, and S. Singh. 2009. Identification of *Pasteurella multocida* isolates of ruminant origin using polymerase chain reaction and their antibiogram study. Trop Anim Health Prod 41(4):573-578. doi: 10.1007/s11250-008-9226-2
- Lin, J., S. X. Huang, and Q. J. Zhang. 2002. Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. Microbes and Infection 4(3):325-331. doi: 10.1016/s1286-4579(02)01545-9
- Lizarazo, Y. A., E. F. Ferri, A. J. de la Fuente, and C. B. Martín. 2006. Evaluation of changes in antimicrobial susceptibility patterns of *Pasteurella multocida* subsp *multocida* isolates from pigs in Spain in 1987-1988 and 2003-2004. Am J Vet Res 67(4):663-668. doi: 10.2460/ajvr.67.4.663
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Tomado de <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/> (Accessed Feb. 2020).

- Magyar, T., and A. J. Lax. 2002. Atrophic Rhinitis. (Text) doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2478/>
- Magyar, T., B. Ujvári, L. Szeredi, N. Virsinger, E. Albert, Z. Németh, E. Csuka, and I. Biksi. 2017. Re-emergence of bovine haemorrhagic septicaemia in Hungary. *Acta Vet Hung* 65(1):41-49. doi: 10.1556/004.2017.004
- May, B. J., Q. Zhang, L. L. Li, M. L. Paustian, T. S. Whittam, and V. Kapur. 2001. Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(6):3460-3465. doi: 10.1073/pnas.051634598
- Mizan, S., A. Henk, A. Stallings, M. Maier, and M. D. Lee. 2000. Cloning and characterization of sialidases with 2-6 ' and 2-3 ' sialyl lactose specificity from *Pasteurella multocida*. *Journal of Bacteriology* 182(24):6874-6883. (Article) doi: 10.1128/jb.182.24.6874-6883.2000
- Muangthai, K., P. Tankaew, T. Varinrak, R. Uthi, S. Rojanasthien, T. Sawada, and N. Sthitmatee. 2018. Intranasal immunization with a recombinant outer membrane protein H based Haemorrhagic septicemia vaccine in dairy calves. *J Vet Med Sci* 80(1):68-76. doi: 10.1292/jvms.17-0176
- Mutters, R., P. Ihm, S. Pohl, W. Frederiksen, and W. Mannheim. 1985. Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis* and *Pasteurella langaa*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 35:309-322.

- Myint, A., and G. R. Carter. 1989. Prevention of haemorrhagic septicaemia in buffaloes and cattle with a live vaccine. *Vet Rec* 124(19):508-509.
- Ogunnariwo, J. A., and A. B. Schryvers. 2001. Characterization of a novel transferrin receptor in bovine strains of *Pasteurella multocida*. *Journal of Bacteriology* 183(3):890-896. (Article) doi: 10.1128/jb.183.3.890-896.2001
- Oh, Y. H., D. C. Moon, Y. J. Lee, B. H. Hyun, and S. K. Lim. 2018. Antimicrobial resistance of. *Vet Rec Open* 5(1):e000293. doi: 10.1136/vetreco-2018-000293
- OIE. 2013. Haemorrhagic Septicaemia. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/HAEMORRHAGIC_SEPTICEMIA.pdf (Accessed Feb. 2019).
- Pasteur. 1880. Sur les maladies virulents et en particulier sur la maladie appelee vulgairement cholera del poules.
- Pedersen, K. B., and F. Elling. 1984. The pathogenesis of atrophic rhinitis in pigs induced by toxigenic *Pasteurella multocida*. *J Comp Pathol* 94(2):203-214.
- Petersen, A., M. Bisgaard, K. Townsend, and H. Christensen. 2014. MLST typing of *Pasteurella multocida* associated with haemorrhagic septicaemia and development of a real-time PCR specific for haemorrhagic septicaemia associated isolates. *Veterinary Microbiology* 170(3-4):335-341. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.02.022
- Petersen, S. K., N. T. Foged, A. Bording, J. P. Nielsen, H. K. Riemann, and P. L. Frandsen. 1991. Recombinant derivatives of *Pasteurella multocida* toxin: candidates for a vaccine against progressive atrophic rhinitis. *Infect Immun* 59(4):1387-1393.

- Petrocchi-Rilo, M., C. B. Gutiérrez-Martín, J. I. Méndez-Hernández, E. F. Rodríguez-Ferri, and S. Martínez-Martínez. 2019. Antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolates recovered from swine pneumonia in Spain throughout 2017 and 2018. *Veterinary and Animal Science* 7:100044. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vas.2018.100044>
- Pijoan, C. 2006. Pneumonic pasteurellosis. Ames, Iowa State University Press, Diseases of Swine, 9th edn.
- Pors, S. E., M. S. Hansen, H. Christensen, H. E. Jensen, A. Petersen, and M. Bisgaard. 2011. Genetic diversity and associated pathology of *Pasteurella multocida* isolated from porcine pneumonia. *Veterinary Microbiology* 150(3-4):354-361. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.02.050
- Praveena, P. E., S. Periasamy, A. A. Kumar, and N. Singh. 2014. Pathology of experimental infection by *Pasteurella multocida* serotype A: 1 in buffalo calves. *Vet Pathol* 51(6):1109-1112. doi: 10.1177/0300985813516647
- Rhoades, K. R., and R. B. Rimler. 1987. Capsular groups of *Pasteurella multocida* isolated from avian hosts. *Avian Dis* 31(4):895-898.
- Rimler, R. B., and J. R. Glisson. 1997. Fowl cholera. Ames, Iowa State University Press., Diseases of poultry.
- Risco, D., P. Fernandez-Llario, J. M. Cuesta, W. L. Garcia-Jimenez, M. Gil, P. Goncalves, R. Martinez, L. Gomez, A. Garcia, J. Rey, M. Hermoso-de-Mendoza, and J. Hermoso-de-Mendoza. 2013. Fatal outbreak of systemic pasteurellosis in a wild boar (*Sus scrofa*) population from southwest Spain. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 25(6):791-794. (Article) doi: 10.1177/1040638713504411

- Ross, R. F. 2006. *Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia. Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases 7(1-2):13-29. (; Review) doi: 10.1017/s1466252307001211
- Rutter, J. M. 1985. Atrophic rhinitis in swine. Adv Vet Sci Comp Med 29:239-279.
- Sarangi, L. N., P. Thomas, S. K. Gupta, A. Priyadarshini, S. Kumar, V. K. Nagaleekar, A. Kumar, and V. P. Singh. 2015. Virulence gene profiling and antibiotic resistance pattern of Indian isolates of *Pasteurella multocida* of small ruminant origin. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 38:33-39. doi: 10.1016/j.cimid.2014.11.003
- Shivachandra, S. B., K. N. Viswas, and A. A. Kumar. 2011. A review of hemorrhagic septicemia in cattle and buffalo. Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases 12(1):67-82. (; Review) doi: 10.1017/s146625231100003x
- Shivachandra, S. B., R. Yogisharadhya, A. Kumar, N. N. Mohanty, and V. K. Nagaleekar. 2015. Recombinant transferrin binding protein A (rTbpA) fragments of *Pasteurella multocida* serogroup B:2 provide variable protection following homologous challenge in mouse model. Research in veterinary science 98:1-6. doi: 10.1016/j.rvsc.2014.11.013
- Singh, B., S. Prasad, M. Verma, and S. D.K. 2014. Estimation of Economic Losses due to Haemorrhagic Septicaemia in Cattle and Buffaloes in India. Agricultural Economics Research Review 27:271-279.
- Soike, D., C. Schulze, P. Kutzer, B. Ewert, E. van der Grinten, A. Schliephake, C. Ewers, A. Bethe, and J. Rau. 2012. Acute pasteurellosis in fallow deer, cattle and pigs in a region of Eastern Germany. Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift 125(3-4):122-128. (Article) doi: 10.2376/0005-9366-125-122

- Tang, X., Z. Zhao, J. Hu, B. Wu, X. Cai, Q. He, and H. Chen. 2009. Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China. J Clin Microbiol 47(4):951-958. doi: 10.1128/JCM.02029-08
- Timsit, E., J. Hallewell, C. Booker, N. Tison, S. Amat, and T. W. Alexander. 2017. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Mannheimia haemolytica, *Pasteurella multocida*, and Histophilus somni isolated from the lower respiratory tract of healthy feedlot cattle and those diagnosed with bovine respiratory disease. Vet Microbiol 208:118-125. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.07.013
- Townsend, K. M., A. J. Frost, C. W. Lee, J. M. Papadimitriou, and H. J. Dawkins. 1998a. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. J Clin Microbiol 36(4):1096-1100.
- Townsend, K. M., D. O'Boyle, T. T. Phan, T. X. Hanh, T. G. Wijewardana, I. Wilkie, N. T. Trung, and A. J. Frost. 1998b. Acute septicaemic pasteurellosis in Vietnamese pigs. Veterinary Microbiology 63(2-4):205-215. doi: 10.1016/s0378-1135(98)00233-8
- Ujvári, B., L. Szeredi, L. Pertl, G. Tóth, K. Erdélyi, S. Jánosi, T. Molnár, and T. Magyar. 2015. First detection of *Pasteurella multocida* type B:2 in Hungary associated with systemic pasteurellosis in backyard pigs. Acta Vet Hung 63(2):141-156. doi: 10.1556/AVet.2015.012
- Vera-Lizarazo, Y. A. 2009. Caracterización fenotípica y molecular de cepas de "*Pasteurella multocida*" aisladas de lesiones neumónicas porcinas., Universidad de León.
- Verma, N. D. 1988. PASTEURELLA-MULTOCIDA B-2 IN HEMORRHAGIC SEPTICEMIA OUTBREAK IN PIGS IN INDIA. Veterinary Record 123(2):63-63.

- Verma, R., and T. N. Jaiswal. 1998. Haemorrhagic septicaemia vaccines. *Vaccine* 16(11-12):1184-1192.
- Verma, S., M. Sharma, S. Katoch, L. Verma, S. Kumar, V. Dogra, R. Chahota, P. Dhar, and G. Singh. 2013. Profiling of virulence associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cattle. *Vet Res Commun* 37(1):83-89. doi: 10.1007/s11259-012-9539-5
- Volker, I., W. Kehler, M. Hewicker-Trautwein, F. Seehusen, J. Verspohl, S. Bilk, and W. Baumgartner. 2014. Re-emergence of haemorrhagic septicaemia in ungulates in Lower-Saxony in Germany. *Vet Rec* 175(18):460. doi: 10.1136/vr.102706
- Wheeler, R. 2009. Outer membrane proteomics of *Pasteurella multocida* isolates to identify putative host-specificity determinants. *Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research* 2(1):1-12 %@ 1754-7431. doi: 10.1093/biohorizons/hzp002
- WHO. 2018. Antimicrobial resistance. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/en/>.
- Wilson, B. A., and M. Ho. 2013. *Pasteurella multocida*: from zoonosis to cellular microbiology. *Clin Microbiol Rev* 26(3):631-655. doi: 10.1128/cmr.00024-13

Capítulo II

Objetivos

OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta tesis es profundizar en el conocimiento de los aislados de *Pasteurella multocida* tipo B descritos en nuestro país y exóticos en el resto de Europa estableciendo de esta forma, las bases para su control. Este objetivo general se ha concretado en los siguientes objetivos específicos:

- Objetivo 1: Estudio de los procesos producidos por *P. multocida* tipo B en el ganado porcino y bovino.
- Objetivo 2: Descripción anatomopatológica de las lesiones producidas por *P. multocida* tipo B en el ganado porcino y bovino.
- Objetivo 3: Caracterización bioquímica y molecular de los aislados de *P. multocida* tipo B procedentes de España.
- Objetivo 4: Determinación de los factores de virulencia asociados a las cepas de *P. multocida* tipo B aisladas en España.
- Objetivo 5: Estudio de la sensibilidad antimicrobiana de los aislados de *P. multocida* tipo B procedentes de ganado porcino y bovino en España.

Estos objetivos específicos se han conseguido mediante el desarrollo de los siguientes estudios:

Estudio 1 (Objetivos 1,2 y 3): “Descripción de los brotes de septicemia hemorrágica por *Pasteurella multocida* tipo B en cerdos criados en extensivo en España”.

Estudio 2 (Objetivos 1,2 y 3): “First outbreak of bovine Haemorrhagic Septicaemia caused by *Pasteurella multocida* type B in Spain”.

Este trabajo ha sido aceptado para su publicación en la revista *Acta Veterinaria Hungarica*. (doi 10.1556/004.2020.00014) y se presenta como indicio de calidad para la lectura y defensa de la tesis doctoral con un factor de impacto (JCR, 2018), de 1.059, situado en el segundo cuartil (66/141) dentro de la categoría de Ciencias Veterinarias.

Estudio 3 (Objetivo 4): “Virulence associated genes in type B *Pasteurella multocida* isolates from free-range swine and cattle in Spain”.

Estudio 4 (Objetivo 3): “Optimización en la aplicación de la espectrometría de masas Maldi-Tof para la identificación de microorganismos patógenos”.

Estudio 5 (Objetivo 5): “Antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* type B isolates associated with acute septicemia in pigs and cattle in Spain”.

Este trabajo ha sido aceptado por la revista BCM Veterinary Research, con un factor de impacto (JCR, 2018), de 1.792, situado en el primer cuartil (32/141) dentro de la categoría de Ciencias Veterinarias.

Capítulo III

Estudios

Estudio 1

Objetivos 1, 2 y 3

Estudio 1: “Descripción de los brotes de septicemia hemorrágica por *Pasteurella multocida* tipo B en cerdos criados en extensivo en España”

Objetivo 1: Estudio de los procesos producidos por *P. multocida* tipo B en el ganado porcino y bovino.

Objetivo 2: Descripción anatomopatológica de las lesiones producidas por *P. multocida* tipo B en el ganado porcino y bovino.

Objetivo 3: Caracterización bioquímica y molecular de los aislados de *P. multocida* tipo B procedentes de España.

Resumen

La septicemia hemorrágica es una enfermedad grave que afecta principalmente al ganado vacuno y al búfalo, endémica en zonas de África y Asia, y que se asocia a infecciones por *Pasteurella multocida subespecie multocida* con implicación de los tipos capsulares B y E.

En este trabajo se describen las características clínicas y lesionales encontradas en 53 brotes de pasteurelisis septicémica en el ganado porcino entre los años 2010 y 2019, en diferentes explotaciones de raza ibérica sometidos a un sistema de cría extensivo en la dehesa.

Los 84 aislados procedentes de los diferentes brotes se identificaron bioquímica y molecularmente, determinando en cada caso la subespecie, el tipo capsular y el biovar. Todos fueron identificados como *P. multocida* subespecie *multocida* tipo B, biovar 3.

Palabras clave: *septicemia hemorrágica, pasteurelisis septicémica, Pasteurella multocida, tipo capsula, biovar.*

1. Introducción

La Septicemia Hemorrágica (SH) es un proceso sistémico que se presenta de forma hiperaguda fundamentalmente en el ganado bovino doméstico y en los búfalos, causado por los serogrupos B y E de *Pasteurella multocida* (De Alwis, 1992). Es una enfermedad de declaración obligatoria incluida en la lista de infecciones e infestaciones de la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE), en vigor en 2019.

Pasteurella multocida es una especie bacteriana que pertenece a la familia *Pasteurellaceae*, incluida dentro del orden *Pasteurellales*. Esta familia comprende 13 géneros, de los que *Pasteurella* es el género tipo e incluye un amplio y variado grupo de bacterias Gram-negativas, que además de ser comensales en humanos y animales, pueden actuar de forma patógena (Christensen and Bisgaard, 2010; Wilson and Ho, 2013). *P. multocida* es la especie tipo de las 20 especies que componen dicho género (List of Prokaryotic names with Standing Nomenclature, LPSN). Pertenecientes a esta especie tipo se clasifican fenotípicamente tres subespecies (*multocida*, *gallicida* y *septica*), en base a diferentes patrones de degradación del dulcitol y el sorbitol (Mutters et al., 1985, Olsen, I. et al., 2005). La subespecie más frecuente en todos los hospedadores es *P. multocida. subsp multocida* (García, 2010.). Además, esta especie se divide en cinco serogrupos o tipos capsulares (A, B, D, E y F), 13 biovares (1-10 y 12-14) y 16 serovares (1-16) en base a la composición del antígeno lipopolisacárido (LPS) (Christensen and Bisgaard, 2000; Rimler and Glisson, 1997).

La enfermedad se puede presentar de forma sobreaguda, aguda, subaguda o crónica. El curso de la SH puede variar desde la muerte súbita (forma sobreaguda) hasta un proceso que se prolonga durante cinco días, caracterizado por una fase inicial con fiebre (a menudo inaparente), una fase respiratoria y una fase terminal de septicemia con decúbito hasta la muerte (De Alwis, 1999; Shivachandra et al., 2011).

La lesión más evidente en un animal que ha muerto a causa de la SH es el edema subcutáneo que se extiende desde la región submandibular hasta el pecho. También puede aparecer edema en la musculatura, en la cavidad torácica y abdominal, en el saco pericárdico o en las articulaciones. El cuadro clínico de la SH en el que aparece sintomatología respiratoria debe de ser diferenciado de la pasteurelosis neumónica. Para ello, se debe tener en cuenta que la SH siempre termina en septicemia, mientras que en la pasteurelosis neumónica los síntomas y lesiones quedan restringidos al tracto respiratorio (De Alwis, 1999).

El diagnóstico laboratorial de la SH se realiza mediante el aislamiento del agente causal, *P. multocida*, en cultivo puro y su posterior identificación mediante técnicas bioquímicas, serológicas o moleculares (OIE, 2013).

En el tratamiento de la SH, se han probado con éxito múltiples grupos de antibióticos (OIE, 2013), aunque estos tratamientos únicamente son útiles si se instauran inmediatamente después de la aparición de los signos clínicos (De Alwis, 1999). La única forma de prevenir la SH es combinando la inmunoprofilaxis con la profilaxis sanitaria (OIE, 2013).

En este estudio se describen las características patológicas comunes de 53 brotes de SH descritos en España entre los años 2010 y 2019, así como de los 84 aislados de *P. multocida* asociados a ellos.

2. Material y métodos

2.1. Descripción de los brotes

Para la realización de este estudio hemos analizado un total de 84 aislamientos de *P. multocida* procedentes de 53 brotes de septicemia en cerdos ibéricos criados en extensivo que fueron diagnosticados entre los años 2010 y 2019 en el Servicio de Diagnóstico de la Unidad de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de Córdoba y procedentes de distintas explotaciones de ganado porcino con sistema de cría extensivo, localizadas en las provincias de Badajoz, Córdoba, Huelva y Sevilla.

En todos los brotes, la edad de los animales afectados osciló entre los 4 y los 8 meses de vida. Los animales afectados muestran un inicio agudo del proceso, sin signos clínicos aparentes de enfermedad, muriendo en un periodo entre 24 y 48 horas.

Conforme el proceso avanza, la sintomatología común en estos brotes es la aparición de un cuadro de tos y severa disnea como consecuencia de una marcada inflamación de la zona ventral de cuello (papada) que dificulta la entrada del aire hacia los pulmones, junto con un proceso septicémico. El área aparece además cianótica y necrótica (Figura 1).



Figura 1.- Mortalidad sobreaguda durante un brote y detalle de la típica congestión y edema en la zona submaxilar.

Bien los animales muertos o bien las muestras recogidas durante las necropsias en campo, se analizaron en el Servicio de Diagnóstico de la Facultad de Veterinaria de Córdoba, donde se les realizaron los posteriores estudios histopatológicos y microbiológicos.

2.2. Análisis histopatológico

El examen post mortem se realizó en el Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas de la Universidad de Córdoba de acuerdo con los procedimientos estándar. Cuando se dispuso del animal completo, se tomaron muestras de tejido a partir de pulmón, hígado, bazo, riñón, corazón, amígdalas y tejido submandibular, así como edema de cada animal después de la necropsia. Las muestras se fijaron en formol tamponado al diez por ciento, se embebieron en parafina, se seccionaron en bloques de 4 mm y se tiñeron con hematoxilina y eosina para su estudio.

2.3. Análisis microbiológico

Las muestras procedentes de pulmón, hígado, bazo, riñón, corazón, ganglios linfáticos, tejido submandibular y edemas se cultivaron en agar sangre, agar McConkey, agar TSN (Tryptone Sulfite Neomycin) y medio Rappaport-Vassiliadis (Oxoid).

El agar sangre, combinación de un agar base suplementado con un cinco por ciento de sangre de ovino desfibrinada y estéril, además de aportar diversos factores de crecimiento, es útil para determinar la capacidad hemolítica de ciertos microorganismos patógenos. El medio McConkey se utilizó para la identificación de los aislados de *P. multocida* y los medios TSN y Rappaport-Vassiliadis para determinar la presencia de otros microorganismos como *Clostridium perfringens* o *Salmonella spp.* Las placas cultivadas se incubaron a 37 °C durante 24-48 horas en condiciones de microaerofilia.

- Identificación bioquímica y molecular

La identificación presuntiva de los aislados se realizó en base a las características macroscópicas y microscópicas de las colonias obtenidas en cultivo puro. Para la identificación bioquímica se emplearon los test de catalasa y oxidasa.

La presencia de la enzima catalasa se determinó depositando una colonia de cada aislamiento sobre un portaobjetos y añadiendo, posteriormente, una gota de agua oxigenada al tres por ciento. La enzima cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en oxígeno y agua, observándose en caso positivo el desprendimiento de burbujas de gas.

Para determinar la presencia de la enzima citocromo-oxidasa se adicionó una pequeña cantidad de colonias bacterianas sobre una tira de papel impregnada con el reactivo N-dimetil-p-fenilendiamina, que se oxida por la citocromo-oxidasa (M-IDENT®-CITOCROMO-OXIDASA; Microkit). En los test positivos, la enzima de la bacteria reacciona con el alfa-naftol y la N-dimetil-p-fenilendiamina de la tira para dar lugar a un producto azul oscuro, el azul de indofenol.

La identificación presuntiva fue posteriormente confirmada mediante una PCR específica para *P. multocida* desarrollada por Townsend y colaboradores en 1998 que amplifica el gen KMT1, obteniéndose en caso positivo un producto de amplificación de 460 pb.

La extracción de ADN se llevó a cabo realizando una suspensión de varias colonias en 100 µl de agua Mili-Q a la que se le adicionaron 100 µl de fenol-cloroformo (Sigma-Aldrich). Después de dejar la mezcla a temperatura ambiente durante 20 minutos, esta se centrifugó a 12000 x g durante cinco minutos para, finalmente, extraer el sobrenadante con el ADN que se conservó hasta su posterior uso a -20°C.

La identificación de la subespecie se realizó mediante pruebas de fermentación del sorbitol y dulcitol (Mutters et al., 1985), mientras que para la determinación del biovar se estudió la producción de la enzima ornitina decarboxilasa (ODC), la actividad de la ureasa y la fermentación de siete carbohidratos: sorbitol, dulcitol, maltosa, xylosa, trehalosa, lactosa y arabinosa (Blackall et al., 1997; Fegan et al., 1995).

La fermentación de los carbohidratos se determinó mediante la siembra en masa de cada aislado en un medio base con púrpura de bromocresol (Oxoid), colocando sobre la superficie de siembra los discos con cada uno de los azúcares (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich), separados a una distancia mínima de 2 cm. Tras la incubación a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18-48 horas, se realizó una primera lectura de los resultados a las 18-24 horas y una segunda lectura a las 48 horas. La fermentación positiva de los carbohidratos se visualizó mediante el viraje del color del medio de violeta a amarillo alrededor del disco.

Para la detección de la actividad ureasa se empleó el agar urea de Christensen (Scharlau) que contiene el indicador rojo fenol, siguiendo las indicaciones del fabricante. En la superficie inclinada (en pico de flauta), se sembraron en estría cada uno de los aislados a testar y se incubaron a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 horas. La lectura de los resultados se realizó mediante la visualización del color del medio de cultivo. Si los aislados no presentaban actividad ureasa, el medio conservaría su color amarillo original, mientras que en el caso de los aislados con actividad ureasa positiva el medio viraría a color rosa fuerte debido a su alcalinización por la degradación de la urea.

Para la detección de la ODC se empleó el medio MIO (movilidad, indol, ornitina) (Scharlau). En este caso, se realizó una inoculación de los aislados por picadura vertical en el medio y la incubación a $35 - 37^{\circ}\text{C}$ durante 28-48 horas. El color púrpura en el medio indicaría una reacción positiva, mientras que el color amarillo en el fondo del tubo, una reacción negativa.

Finalmente, para eliminar la posible subjetividad en la lectura de esta prueba, diseñamos una PCR que amplifica el gen que codifica la enzima ODC, utilizando para ello el programa informático Oligo 7-NewSequence. La secuencia de nucleótido del gen así como los cebadores diseñados se detallan en la Figura 2.

TGCTCAAAACACGCTGCTCAAGTCTTTAATGCTGATAAAACCTACTTCGTCTTAAAT
 GGGACATCTTCTGCAAATAAAGTCGTCACCAATGCGTTACTCACACCGGGTGATCT
 TGTGCTCTTTGATCGTAACAATCACAAATCTATCCATCACGGTGCATTAATTCAAGCT
 GGTGCTACCCCTGTTTATTTGGAACTGCGCGTAATCCATTTGGTTTTATCGGTGGG
 ATCGATAGCCATTGTTTTGATGAAGATTATTTGAAATCTTTAATTAAGATGTTGCGC
 CTGAAAACTAACACAAGCACGTCCTTTCCGTTTAGCCGTTATTCAGCTCGGCACTT
 ATGACGGAACCATCTATAATGCGCGCCAAGTCGTAGATAAAATTGGTCATTTATGTG
 ACTACATCTTGTTTGATTCTGCGTGGGTAGGTTATGAACAATTCATTCCAATGATGA
 AAGATTGCTCACCGCTCTTGCTTGAATTAATGAAAATGATCCCGGCATCATCGTGA
 CACAATCAGTACACAAACAACAAGCCGGCTTCTCACAAGCCTCACAAATTCACAAAA
 AAGACAAGCACATTAAAGGTCAACAGCGCTACTGTAATCATAAACGCTTTAATAATG
 CATTC**ATGTTACACGCCTCCACCAG**

Figura 2 Secuencia del gen que codifica la enzima ornitina descarboxilasa en *P. multocida subs multocida* str. Pm70. Los cebadores aparecen resaltados en azul.

Las cantidades de reactivos empleados para la mezcla de esta PCR y las condiciones para su reacción se encuentran descritos en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

Tabla 1: Volúmenes de reactivos empleados en la PCR para la detección de la ornitina decarboxilasa (ODC) en *P. multocida* subs. *multocida*

Reactivos	Volumen (µl)
Agua destilada estéril (Sigma)	16,125
Tampón 10X con MgCl ₂ (25 mM, Biotools)	1,5
Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs, 10mM,(Biotools)	0,5
Cebadores (20 mM)	0,625 (cada uno)
Taq DNA polimerasa (1 U, Biotools)	0,625
ADN extraído	5
Total	25

Tabla 2: Condiciones de la PCR para la detección del gen de la ornitina decarboxilasa (ODC) en *P. multocida* subs. *multocida*

Fase	Ciclos (n)	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización	1	95	5 minutos
Desnaturalización	30	95	1 minuto
Hibridación	30	55	30 segundos
Elongación	30	72	3 minutos
Elongación final	1	72	10 minutos

La determinación del tipo capsular se realizó en base a una PCR múltiple que diferencia los cinco tipos capsulares de *P. multocida* (Townsend et al., 2001). La metodología fue similar a la descrita por estos autores pero con la variación de que en este estudio, se realizó la técnica de PCR para el tipo capsular B de forma independiente, pues se trata del tipo capsular esperado dada la sintomatología del proceso. Los aislados que no pertenecieron al tipo capsular B fueron sometidos a la PCR múltiple. En todos los casos se incluyeron las cepas de referencia: NCTC

43137 (tipo A), CECT 962 (tipo B), CECT 4325 (tipo D), CECT 902 (tipo E) y NCTC 103226 (tipo F).

Las amplificaciones se realizaron en todos las PCR de este estudio en un termociclador modelo Mastercycler Gradient (Eppendorf). La visualización de los productos de PCR se efectuó en geles de agarosa al 1% en TAE 1x con RedSafeTM (INtRON Biotechnology), en un transiluminador de luz ultravioleta (Gel Doc 2000, BioRad). Cada amplificación realizada incluyó un control positivo con la cepa tipo correspondiente y, además, un control negativo que contenía todos los reactivos excepto el ADN problema, sustituyendo estos 5 µl con agua destilada estéril.

3. Resultados

El examen post mortem de los tejidos procedentes de aquellos animales que murieron durante los brotes, revela de forma constante hemorragias petequiales en todas las membranas serosas, siendo lo más llamativo, el edema submandibular y la congestión a nivel pulmonar, con un fuerte edema, consolidación y coloración roja oscura en los lóbulos caudales. Los ganglios linfáticos mediastínicos y mesentéricos, así como el resto de órganos parenquimatosos aparecen congestivos y hemorrágicos (figura 3).



Figura 3: Lesiones macroscópicas en los animales afectados. Congestión y hemorragias en mucosa gástrica, pulmones y bazo.

Microscópicamente se observan áreas multifocales de necrosis junto con edema e infiltrado de neutrófilos y trombos de fibrina en el tejido adiposo, mucosa oral, pulmones y nódulos linfáticos, apareciendo de forma constante una pleuroneumonía hemorrágica y fibrinosa aguda y paniculitis hemorrágica aguda (figura 4).

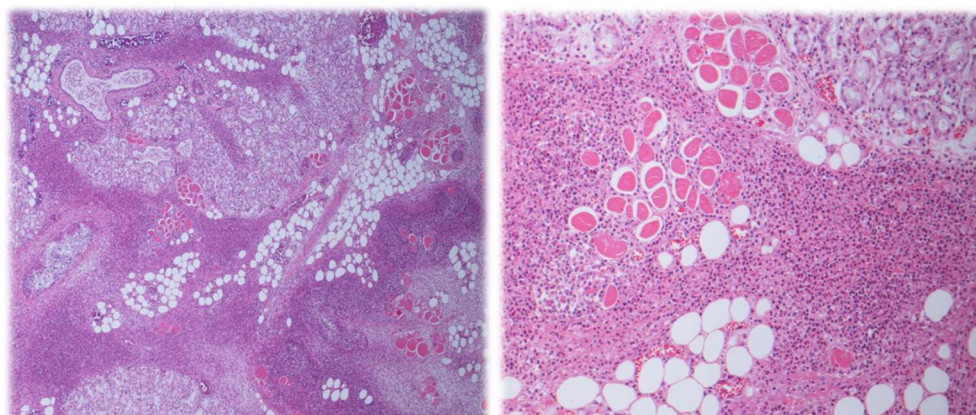


Figura 4: Lesiones microscópicas en los animales afectados. Pleuritis fibrinosa y congestión marcada del parénquima pulmonar y éxtasis de los vasos linfáticos. Edema alveolar, infiltrado de neutrófilos y abundantes bacterias.

El análisis histopatológico condujo al diagnóstico de pleuroneumonía aguda, difusa, hemorrágica y fibrinosa y paniculitis hemorrágica aguda.

Los cultivos bacterianos obtenidos a partir de las muestras procedentes de diferentes órganos y fluidos de los animales analizados dieron como resultado, generalmente, el crecimiento de cultivos bacterianos puros en agar sangre. En cuanto al aspecto, los aislados formaron colonias de blanquecinas a grisáceas, mucosas y redondeadas. La tinción de Gram reveló en todos los casos la presencia de cocobacilos gram negativos. Las bacterias aisladas mostraron reacción positiva a los tests de la catalasa y oxidasa. Así mismo, no se apreció crecimiento bacteriano en agar McConkey. A partir de estos resultados, se realizó una primera identificación presuntiva como *P. multocida* que fue posteriormente confirmada mediante la detección del gen KMT1 en una PCR específica de especie, que dió como resultado en todos los casos un amplicón de 460 pb.

Posteriormente, en base a los resultados obtenidos en los ensayos de fermentación de los azúcares dulcitol (negativo) y sorbitol (positivo), se determinó que todos los aislados pertenecían a la subespecie *multocida* (Mutters et al., 1985).

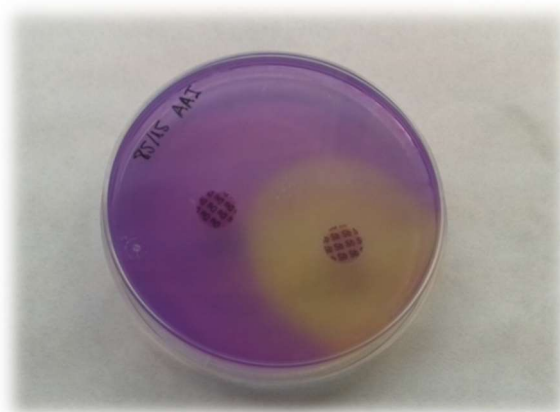


Figure 5: Prueba de fermentación de carbohidratos. Resultado de un aislado *P. multocida sbp multocida*. A la derecha se observa el resultado positivo a la fermentación (sorbitol) y a la izquierda el resultado negativo (dulcitol).

Además de las reacciones anteriores, los aislados fermentaron la xilosa y lactosa, pero no la maltosa, trehalosa y arabinosa, no hidrolizaron la urea y fueron positivos a la producción de la enzima ornitina descarboxilasa, por lo que se asignaron al biovar 3.

Para solventar la dificultad que en ocasiones entraña la interpretación de la prueba de la ornitina-decarboxilasa, pusimos a punto una PCR que amplifica un gen que codifica para esta enzima en *P. multocida subs multocida* obteniendo como resultado un amplicón de 654 pb. El resultado de estas pruebas confirmó que todas las cepas estudiadas pertenecían al biovar 3.

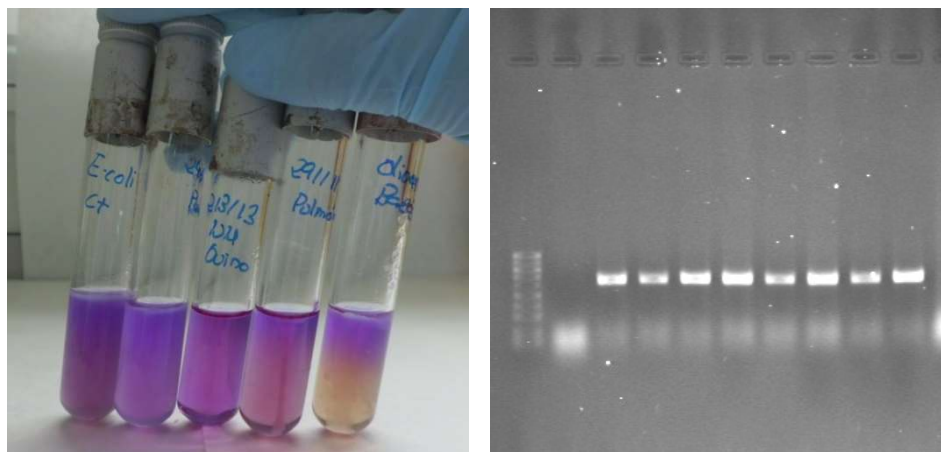


Figura 6: Resultados de las pruebas ODC en medio MIO y de la PCR para detectar el gen de la enzima ODC. pb: marcador de tamaño molecular (100 pb), línea 2: muestra negativa de control, línea 3: muestras positiva de control, línea 4-10: muestras positivas.

Así mismo, todos los aislados seleccionados dieron lugar a la amplificación de un fragmento de 760 pb en la PCR para la identificación del tipo capsular, siendo clasificados como tipo capsular B.

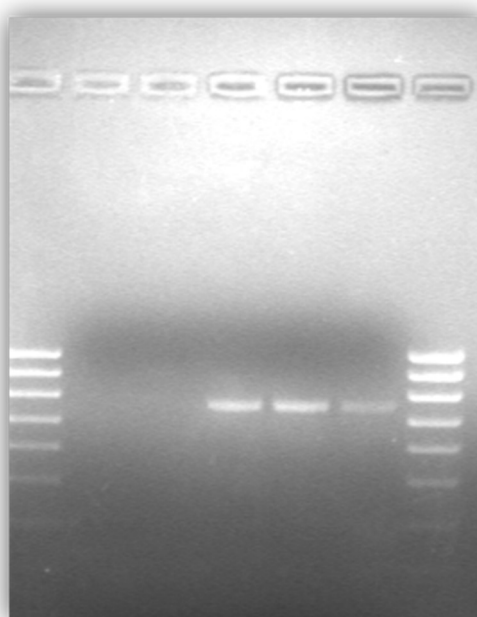


Figure 7: Amplificación por PCR de *Pasteurella multocida* tipo B a partir de muestras de bazo. pb: marcador de tamaño molecular (100 pb), línea 2, 3: muestra negativa de control, línea 3: muestra positiva de control, línea 4, 5, muestras positivas.

4. Discusión

Tras el análisis histopatológico y microbiológico de las muestras, en el año 2009 se diagnosticó el primer brote de SH en ganado porcino en España causado por *P. multocida subsp multocida*, tipo capsular B y biovar 3 (Borge et al., 2011).

En Europa, la SH es una enfermedad extremadamente inusual, pero desde su primera aparición en España, ocurren numerosos brotes en diversas zonas de nuestro país, tanto en porcino como jabalí (Cardoso-Toset et al., 2013; Risco et al., 2013). El desarrollo de la forma aguda coincide con los brotes esporádicos descritos tanto en España, como en Europa (Magyar et al., 2017; Soike et al., 2012; Ujvári et al., 2015), o con aquellos que se producen de forma endémica, afectando a bóvidos y búfalos, en algunas áreas de Asia y África (De Alwis, 1992). Las lesiones macroscópicas descritas por dichos autores como son la aparición de edema subcutáneo en las regiones submandibular y ventral del cuello y la distribución de hemorragias (desde petequias hasta congestión severa) en todos los órganos de los animales afectados, se corresponden con las descritas en este estudio. A nivel microscópico destacan la aparición de edema, distintos tipos de hemorragias y un fuerte infiltrado de neutrófilos y linfocitos que tienen como consecuencia una severa paniculitis a nivel submandibular.

La infección natural en esta enfermedad se produce por inhalación y/o ingestión de materiales contaminados procedentes de animales clínicamente infectados o portadores sanos que entran en contacto por primera vez en un área libre de enfermedad (Shivachandra et al., 2011).

Generalmente, *P. multocida* no persiste fuera del hospedador durante largos periodos de tiempo, sin embargo, los suelos húmedos, las carcasas de animales infectados o los pastos contaminados pueden prolongar su persistencia en el medio (De Alwis, 1999).

Hasta el momento, en ninguno de los brotes hemos podido determinar la fuente de infección que los originó. No obstante, al tratarse en todos los casos de animales criados en régimen extensivo, la principal hipótesis es que la aparición del proceso se debiera al contacto con la fauna silvestre local, fundamentalmente ciervos, gamos, corzos o jabalíes y con posterioridad el microorganismo haya podido resistir acantonado en anillo esofágico permaneciendo los animales como portadores inaparentes en las explotaciones. Estudios previos han sugerido que la fauna silvestre podría ser un reservorio de SH tras describir dos brotes de SH en ungulados domésticos y silvestres en una misma región de Alemania (Soike et al., 2012; Volker et al., 2014). Los animales afectados en los brotes descritos en este estudio tienen en común pertenecer a la raza ibérica, criada en sistema extensivo en la dehesa, lo que facilita el contacto y la interacción entre especies domésticas y silvestres que comparten un mismo ecosistema y donde enfermedades como la tuberculosis, paratuberculosis, brucelosis, salmonelosis o lengua azul, entre otras, son consideradas “enfermedades compartidas”.

En este sentido, los resultados del Plan de Vigilancia Epidemiológica de la Fauna Silvestre en Andalucía (fases I y II), llevado a cabo por la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía entre los años 2009 a 2014, muestran una baja prevalencia (fase I de 3,3% y fase II, de 1.9%) de aislados de *P. multocida*

a partir de pulmones y nódulos linfáticos procedentes de animales abatidos en monterías en estas especies.

En nuestra opinión, esta prevalencia puede estar subestimada, pues al tratarse de animales presumiblemente sanos, es probable que en el caso de tratarse de portadores de *P. multocida*, no lo sean a nivel de pulmón sino de anillo nasoesofágico tal y como describe De Alwis en 1999 y como muestran recientes estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación (datos no mostrados). También se han encontrado mayores tasas de aislamiento de este agente (8,1%) en cabras montés en Andalucía, a partir de hisopos frescos de conjuntiva y mucosa nasal (González-Candela et al., 2006).

En España, hay antecedentes de mortandades de ciervos que, tras las investigaciones correspondientes, han sido asociadas a la proliferación de *Pasteurella spp*. Cabe destacar el hallazgo de más de un centenar de ejemplares de ciervo, muertos en las provincias de Zamora y León durante el verano de 2010. Fue el laboratorio Central de Veterinaria de Algete en Madrid quien confirmó la implicación de *Pasteurellas spp*, posiblemente asociado a una proliferación de la misma como consecuencia de cambios bruscos de temperatura (Gajate M . y Jimeno I., 2010).

La SH está normalmente asociada con climas húmedos (Shivachandra et al., 2011), sin embargo otros autores, coincidiendo con nuestras observaciones, afirman que la SH puede ocurrir a lo largo de todo el año independientemente de la estación (Kumar et al., 2004).

La SH es actualmente una enfermedad emergente en países desarrollados. La continua aparición de brotes en España causados por *P. multocida* tipo B en diferentes años, sugiere que esta enfermedad podría ser endémica en ciertas áreas con sistemas de producción extensivos.

El aislamiento de *P. multocida* en todos los casos fue determinante para el diagnóstico de la SH. Además, como se esperaba, todos los aislados causantes de los brotes de SH en porcino pertenecieron al tipo capsular B, tipo capsular relacionado con los procesos de pasteurellosis septicémica (De Alwis, 1992).

Aunque pocos son los trabajos que llevan a cabo la identificación del biovar, hasta la fecha el biovar tipo 3 es reconocido como predominante entre los aislados de *P. multocida* en el ganado porcino (García, 2010; Jamaludin et al., 2005; Magyar et al., 2017; Townsend et al., 1998; Ujvári et al., 2015). De forma anecdótica, Cardoso-Toset y colaboradores, describen en 2013 un aislado de *P. multocida* tipo B, asociado a un brote de septicemia hemorrágica en porcino en España perteneciente al biovar 13. La diferencia entre el biovar 3 y el 13 se limita al resultado de ambos biovars en la prueba de la ornitina descarboxilasa (ODC), positiva en el biovar 3 y negativa en el 13. En nuestra opinión, la interpretación de esta prueba puede llevar a confusiones debido a la subjetividad en la lectura de su resultado en la prueba bioquímica. En nuestro trabajo comprobamos que el tenue cambio de color del medio que provocan algunos aislados podría llevar a una lectura errónea, por lo que pusimos a punto una PCR para detectar la presencia del gen que codifica esta enzima. Los resultados obtenidos de esta

prueba nos permitieron clasificar los 84 aislados como biovar 3, el más común esperado.

Referencias

- Blackall, P.J., Pahoff, J.L., Bowles, R., 1997. Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian pigs. *Veterinary Microbiology* 57, 355-360.
- Borge, C., Barranco, I., Márquez del Cid, J.M., Rodríguez-Guerra, M.A., Carbonero, A., Carrasco, L., Perea, A. 2011. Outbreak of acute septicaemia by *Pasteurella multocida* type B in pigs reared in extensive system in Spain. In: 3rd European Symposium of Porcine Health and Management (ESPHM). Espoo, Finland, 127.
- Cardoso-Toset, F., Gomez-Laguna, J., Callejo, M., Vela, A.I., Carrasco, L., Fernandez-Garayzabal, J.F., Maldonado, A., Luque, I., 2013. Septicaemic pasteurellosis in free-range pigs associated with an unusual biovar 13 of *Pasteurella multocidas*. *Veterinary Microbiology* 167, 690-694.
- Christensen, H., Bisgaard, M., 2010. Molecular classification and its impact on diagnostics and understanding the phylogeny and epidemiology of selected members of Pasteurellaceae of veterinary importance. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 123, 20-30.
- Christensen, J.P., Bisgaard, M., 2000. Fowl cholera. *Rev Sci Tech* 19, 626-637.
- De Alwis, M.C.L. 1999. Haemorrhagic Septicaemia (ACIAR Monograph).
- Fegan, N., Blackall, P.J., Pahoff, J.L., 1995. Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian poultry. *Veterinary Microbiology* 47, 281-286.
- Gajate M . y Jimeno I, (17 de agosto de 2010). Las altas temperaturas provocan la pasteurelosis que mató a cien ciervos. ABC. Recuperado de https://www.abc.es/espana/castilla-leon/altas-temperaturas-provocan-pasteurelosis-201008170000_noticia.html

- García, N., 2010. Caracterización fenotípica y genética de aislados de *Pasteurella multocida* obtenidos de ganado porcino. Universidad Complutense de Madrid. Tesis Doctoral.
- González-Candela, M., Cubero-Pablo, M.J., Martín-Atance, P., León-Vizcaíno, L. 2006. Potencial pathogens carried by Spanish Ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) in Southern Spain. *Journal of Wildlife Diseases*, 42 (2), pp. 325-334.
- Magyar, T., Ujvári, B., Szeredi, L., Virsinger, N., Albert, E., Németh, Z., Csuka, E., Biksi, I., 2017. Re-emergence of bovine haemorrhagic septicaemia in Hungary. *Acta Vet Hung* 65, 41-49.
- Mutters, R., Ihm, P., Pohl, S., Frederiksen, W., Mannheim, W., 1985. Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis* and *Pasteurella langaa*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 35, 309-322.
- OIE 2013. Haemorrhagic Septicaemia.
- Olsen, I., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., y Busse, H. J. (2005). Family I. Pasteurellaceae Pohl 1981b, 382 VP. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley and G.M. Garrity (eds.). 2, 851-856.
- Plan de Vigilancia Epidemiológica de la Fauna Silvestre en Andalucía. Fase I. Octubre 2013. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. Junta de Andalucía.
- Plan de Vigilancia Epidemiológica de la Fauna Silvestre en Andalucía. Fase II. 2018 Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. Junta de Andalucía.
- Rimler, R.B., Glisson, J.R., 1997. Fowl cholera. Ames, Iowa State University Press., Diseases of poultry.

- Risco, D., Fernandez-Llario, P., Cuesta, J.M., Garcia-Jimenez, W.L., Gil, M., Goncalves, P., Martinez, R., Gomez, L., Garcia, A., Rey, J., Hermoso-de-Mendoza, M., Hermoso-de-Mendoza, J., 2013. Fatal outbreak of systemic pasteurellosis in a wild boar (*Sus scrofa*) population from southwest Spain. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 25, 791-794.
- Shivachandra, S.B., Viswas, K.N., Kumar, A.A., 2011. A review of hemorrhagic septicemia in cattle and buffalo. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases* 12, 67-82.
- Soike, D., Schulze, C., Kutzer, P., Ewert, B., van der Grinten, E., Schliephake, A., Ewers, C., Bethe, A., Rau, J., 2012. Acute pasteurellosis in fallow deer, cattle and pigs in a region of Eastern Germany. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 125, 122-128.
- Townsend, K.M., Boyce, J.D., Chung, J.Y., Frost, A.J., Adler, B., 2001. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 924-929.
- Townsend, K.M., Frost, A.J., Lee, C.W., Papadimitriou, J.M., Dawkins, H.J., 1998a. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J Clin Microbiol* 36, 1096-1100.
- Ujvári, B., Szeredi, L., Pertl, L., Tóth, G., Erdélyi, K., Jánosi, S., Molnár, T., Magyar, T., 2015. First detection of *Pasteurella multocida* type B:2 in Hungary associated with systemic pasteurellosis in backyard pigs. *Acta Vet Hung* 63, 141-156.
- Wilson, B.A., Ho, M., 2013. *Pasteurella multocida*: from zoonosis to cellular microbiology. *Clin Microbiol Rev* 26, 631-655.

Estudio 2

Objetivos 1, 2 y 3

Estudio 2: “*First outbreak of bovine Haemorrhagic Septicaemia caused by Pasteurella multocida type B in Spain – Short communication*”. Cuevas et al. 2020. *Acta Veterinaria Hungarica*. 2020 May 4. doi: 10.1556/004.2020.00014. Online ahead of print.

Objetivo 1: Estudio de los procesos producidos por *P. multocida* tipo B en el ganado porcino y bovino.

Objetivo 2: Descripción anatomopatológica de las lesiones producidas por *P. multocida* tipo B en el ganado porcino y bovino.

Objetivo 3: Caracterización bioquímica y molecular de los aislados de *P. multocida* tipo B procedentes de España.

***First outbreak of bovine Haemorrhagic Septicaemia caused by
Pasteurella multocida type B in Spain – Short communication.***

Inmaculada Cuevas^a Alfonso Carbonero^a, David Cano^a, Isabel L. Pacheco, Juan C^{a,c}.
Marín, Carmen Borge^{a1}.

^a Department of Animal Health (AGR-149). University of Córdoba - Campus of
International Agri-Food Excellence CeIA3.

^b Department of Pathological Anatomy. University of Córdoba - Campus of
International Agri-Food Excellence CeIA3.

^c Veterinary Consultant.

*Corresponding author. Tel: +34 957 218727. *E-mail address:*

carmen.borge@uco.es (Carmen Borge).

Short title: First outbreak of HS in cattle in Spain.

Abstract

This paper describes the first documented outbreak of haemorrhagic septicaemia (HS) caused by *Pasteurella multocida* type B in cattle in Spain. This acute, highly fatal septicaemia causes major economic losses in cattle and buffaloes in many areas of Asia and Africa. In other species and European countries is an unfrequently reported disease. Acute septicaemic pasteurellosis occurred in a free-range farm of 150 cattle and 70 beef calves in Southern Spain. Twenty-one calves and one cow were affected, whom died three calves and the adult cow. Post-mortem examination revealed characteristic oedema in the ventral area of the neck as well as brisket regions and widespread haemorrhages in all organs. Pure cultures of *Pasteurella multocida* were obtained from all tissues and organs studied. The aetiological agent was further confirmed by molecular and biochemical analysis as *P. multocida* capsular type B, biovar 3. Although the source of infection could not be determined, wildlife may play an important role. The use of antibiotics in an initial stage of the disease, might be related with the low morbidity and mortality of this outbreak. After using an autogenous vaccine no more cases of HS were observed.

Keywords: *Outbreak, haemorrhagic septicaemia, Pasteurella multocida, capsular type B, septicaemic pasteurellosis, bovine.*

Haemorrhagic septicaemia (HS) is an acute, highly fatal and septicaemic disease caused by the capsular types B or E of *Pasteurella multocida* (Shivachandra *et al.*, 2011). This heterogeneous pathogen is classified into three subspecies (*multocida*, *septica* and *gallicida*), five capsular types (A, B, D, E and F), 16 somatic serotypes (1-16) and 13 biovars (1-10 and 12-14) (Harper *et al.*, 2006).

In pigs, sporadic outbreaks of HS have been reported in different continents such as Asia (Gamage *et al.*, 1995; Townsend *et al.*, 1998b; Verma, 1988) and Europe (Soike *et al.*, 2012; Ujvári *et al.*, 2015), including Spain (Cardoso-Toset *et al.*, 2013). In cattle and buffaloes, in contrast, HS is considered an endemic disease in some areas of Asia and Africa, causing high morbidity, mortality and important economic losses (De Alwis, 1992). North America and Europe have also reported sporadic cases of HS in cattle and wild ruminants (Eriksen *et al.*, 1999; Magyar *et al.*, 2017; Soike *et al.*, 2012; Ujvári *et al.*, 2015). However, in Spain, this disease has not been reported yet in cattle. The aim of this study is to describe the first outbreak of bovine HS caused by *P. multocida* type B in Spain.

An outbreak of acute septicaemia occurred on a free-range system farm of beef cattle in Southern Spain (February, 2015). This herd contained 220 animals, including 150 adults cattle and 70 calves. Their feeding was pasture-based system and supplemented with commercial feed. Ad libitum water was provided from a natural source, also frequented by local wildlife like wild boar (*Sus scrofa*) and red deer (*Cervus elaphus*). All adults cattle were routinely vaccinated against *Clostridium perfringens* while calves did not received any treatments.

The acute septicaemia affected 21 calves and one cow. The most characteristic findings in sick calves were a marked oedema of the ventral area of the neck, fever, respiratory distress and nasal discharge. Three of the affected calves died in a few hours and the adult cow died suddenly without evident clinical signs. Remaining sick calves recovered after emergency treatment with tulathromycin (injected subcutaneously in the neck as a single dose of 2.5 mg/kg body weight) after the first detection of clinical symptoms. Dead animals were submitted to the Department of Animal Health and Pathological Anatomy of the Faculty of Veterinary (University of Córdoba) for its necropsy as well as histopathological and microbiological examination.

Post-mortem examination was performed according to standard procedures. Tissue samples from lung, liver, spleen, kidney, heart, tonsil and submandibular tissue as well as oedema from each animal were collected after necropsy. The samples were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned at 4 mm sections and stained with haematoxylin and eosin for the histopathological study and for the microbiological study.

The ventral area of the neck and cranial area of the thorax revealed severe oedema and when sectioned, showed also subcutaneous and muscular petechial haemorrhages. There was an accumulation of fluid in the pericardial sac (hydropericardium), chest (hydrothorax) and abdomen (ascites). Multiple haemorrhages appeared widespread in all organs (Figure 1).

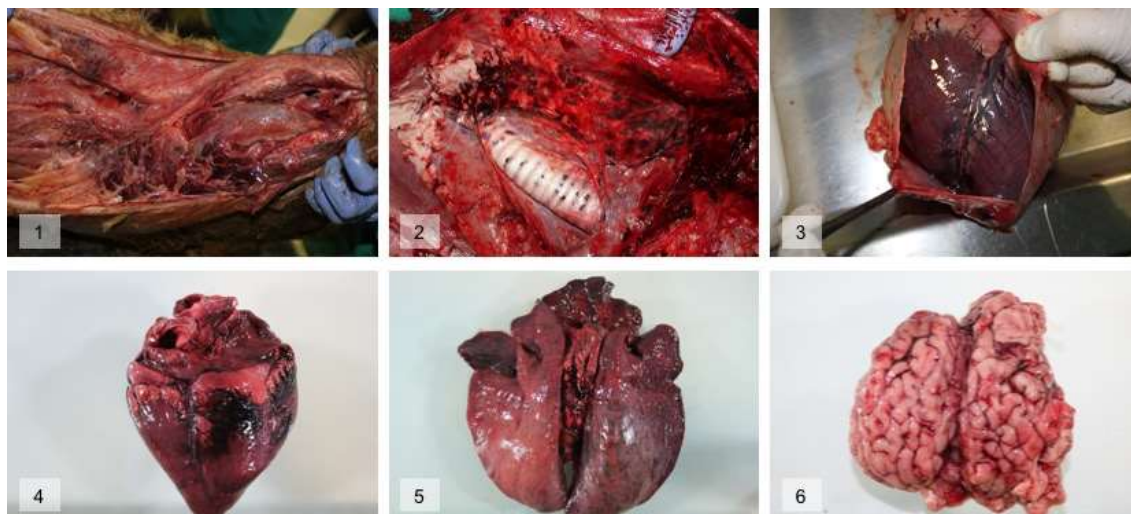


Figure 1. Gross lesions: Oedema and haemorrhages in the ventral area of the neck (1) and cranial area of the thorax (2), hydropericardium (3), haemorrhages in the heart (4) and cranial as well as caudal lobes of the lung (5) and congestion of central nervous system.

Histopathological examination revealed oedema in the neck tissue and bacteria foci in dermis. The lung tissue showed hyperaemia, alveolar oedema, emphysema, severe congestion and micro-thrombi. Diffuse oedema was present in cardiac muscle fibers. Kidney, lymph nodes, stomach and thymus revealed severe hyperaemia. Bacteria foci were present in kidney and lymph nodes. Spleen showed lymphoid depletion with a few amount of blood and lymphocytes (Figure 2).

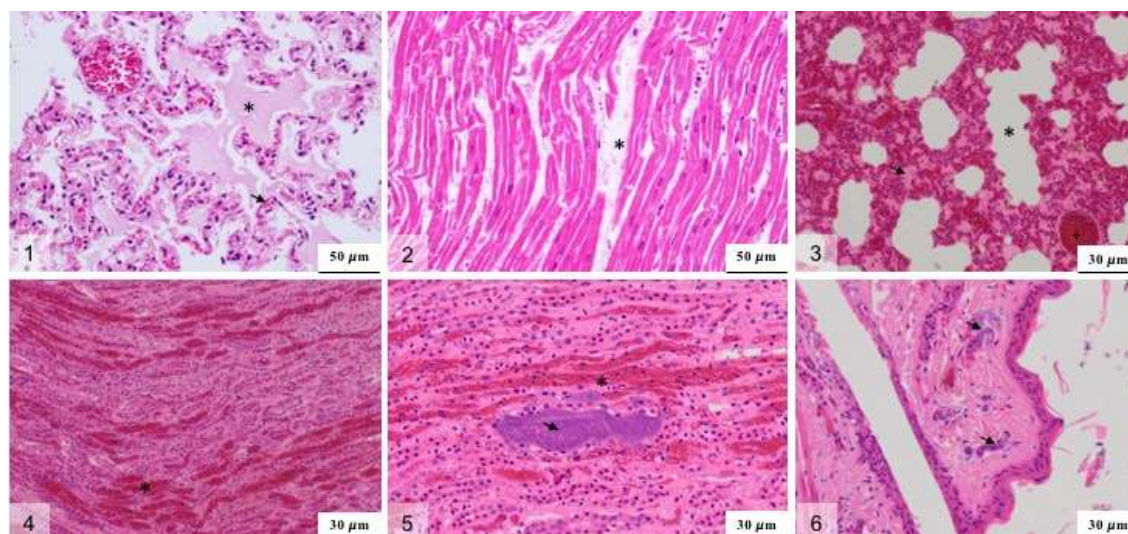


Figure 2. Histopathological lesions: Alveolar oedema (*) and microhaemorrhages (arrow) in the lung (1). Oedema (*) between cardiac muscle fibers (2). Oedema (arrow), emphysema (*) and severe congestion (+) in the lung tissue (3). Severe hyperaemia (*) and bacteria foci (arrow) in the kidney (4,5). Group of bacteria (arrow) in the dermis (6).

Samples of all organs and fluids were plated on *blood agar*, *McConkey agar*, *TSN agar* and *Rappaport-Vassiliadis medium* (Oxoid) and incubated at 37°C for 24-48 h under microaerobic conditions. Based on colony morphology, Gram staining, oxidase and catalase tests (Gram-negative coccobacilli, catalase and oxidase positive), a first hypothetical identification as *P. multocida* was accomplished. The identification was further validated by detection of KMT1 gene through a species-specific PCR assay (Townsend *et al.*, 1998a). After confirmation, subspecies was determined based on sorbitol and dulcitol fermentation (Mutters *et al.*, 1985), biovar on the production of the enzyme ornithine decarboxylase, urease activity and fermentation of seven carbohydrates: dulcitol, sorbitol, lactose, maltose, arabinose, xylose and trehalose (Blackall *et al.*, 1997) and capsular type by a multiplex PCR (Townsend *et al.*, 2001). Isolates were phenotypically and molecularly characterized as *P. multocida subsP. multocida* capsular type B and

biovar 3. Isolated strains were tested by disc diffusion test against amoxicillin, gentamicin, ceftiofur, florfenicol, tulathromycin, oxytetracycline.

After a month of the first outbreak, six new calves were affected by HS. To control this second outbreak an autovaccine containing 1×10^8 cfu/ml of the *P. multocida* type B was elaborated at the Department of Animal Health at the University of Córdoba (unpublished data). Briefly, *P. multocida* type B isolates were cultivated in blood agar (Oxoid) at 37°C for 24 h and inactivated with 0.3% formaldehyde (30-40% w/v, Panreac, Spain). The suspension was centrifuged at 720 g for 15 min at 4°C and the pellets were re-suspended in an iso-tonic saline solution until the pattern 0.5 in the *McFarland* scale was obtained. The vaccination scheme consisted a first dose of 4 ml subcutaneous doses for adults and 3 ml for calves, followed by revaccination one month later and subsequent doses every year. No more animals fell ill or died by *P. multocida* type B infection after the autovaccine treatment.

In Europe, HS is an extremely uncommon disease that was detected for the first time in free-range pigs in Spain in 2009 (Borge et al. 2011). Since then, *P. multocida* type B has also been detected in either HS outbreaks in pigs (Cardoso-Toset et al., 2013) and wild boar (Risco et al., 2013) in this country. To our knowledge, this disease has not been previously reported in bovine in Spain, so this is the first study describing the characteristic of an outbreak of HS in cattle in this country. This disease seems to be becoming endemic in this country and can cause important economic losses if it is not quickly recognized and treated.

Although the source of infection could not be accurately determined, it may be related to the contact with wildlife. The affected animals were raised in extensive feeding systems, which facilitates contact among wild and domestic species. Despite wildlife mortality has not been reported in the affected region, previous authors described two outbreaks of HS involving wild and domestic ungulates in the same area of Germany (Soike *et al.*, 2012; Volker *et al.*, 2014). In fact, the role of fallow deers and red deers as healthy carriers has been previously reported (Soike *et al.*, 2012). However, the lack of data of neighbouring areas made it unable to establish a certain epidemiological relationship.

Despite case fatality is nearly 100% when HS is first introduced in an area (De Alwis, 1992), in this study, morbidity and mortality were low (10% and 18%, respectively). This controversy has also been found in the literature. While low morbidity and mortality was reported in wild boar (Risco *et al.*, 2013), swine (Ujvári *et al.*, 2015) and cattle (Magyar *et al.*, 2017; Ujvári *et al.*, 2015). Cardoso-Toset *et al.* (2013) described high morbidity and mortality rates in swine (70% and 95%, respectively). This differences might be due to the precocity of the treatment administrated. High recovery rates have been reported when antibiotics are used at early stage of the disease (Shivachandra *et al.*, 2011). Interestingly, in the outbreaks with low morbidity and mortality, as in our case, treatment immediately after the onset was carried out (Magyar *et al.*, 2017; Risco *et al.*, 2013; Ujvári *et al.*, 2015) while any information about treatment has been provide by Cardoso-Toset *et al.* (2013). This data suggest that an early treatment with antibiotic is effective to minimize the losses. According with the recommendation of using killed

vaccines to prevent new cases of HS (*Shivachandra et al.*, 2011), the treatment with an autovaccine avoided more outbreaks in the farm.

Acknowledgments

The authors thank the farmer and clinical veterinarian for providing samples and information about the case as well as the staff of the Animal Health and Pathological Anatomy Departments of the Córdoba University.

References

- Blackall, P.J., Pahoff, J.L., Bowles, R. (1997). Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian pigs. *Vet Microbiol* 57, 355-360.
- Cardoso-Toset, F., Gomez-Laguna, J., Callejo, M., Vela, A.I., Carrasco, L., Fernandez-Garayzabal, J.F., Maldonado, A., Luque, I. (2013). Septicaemic pasteurellosis in free-range pigs associated with an unusual biovar 13 of *Pasteurella multocidas*. *Vet Microbiol* 167, 690-694.
- De Alwis, M.C. (1992). Haemorrhagic septicaemia--a general review. *Br Vet J* 148, 99-112.
- Eriksen, L., Aalbaek, B., Leifsson, P.S., Basse, A., Christiansen, T., Eriksen, E., Rimler, R.B. (1999). Hemorrhagic septicemia in fallow deer (*Dama dama*) caused by *Pasteurella multocida* multocida. *J Zoo Wildl Med* 30, 285-292.
- Gamage, L.N.A., Wijewardana, T.G., Bastiansz, H.L.G., Vipulasiri, A.A. (1995). An outbreak of acute pasteurellosis in swine caused by serotype B:2 in Sri Lanka. *Sri Lanka Veterinary Journal* 42, 15-19.
- Harper, M., Boyce, J.D., Adler, B. (2006). *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiol Lett* 265, 1-10.

- Magyar, T., Ujvári, B., Szeredi, L., Virsinger, N., Albert, E., Német, Z., Csuka, E., Biksi, I. (2017). Re-emergence of bovine haemorrhagic septicaemia in Hungary. *Acta Vet Hung* 65, 41-49.
- Mutters, R., Ihm, P., Pohl, S., Frederiksen, W., Mannheim, W. (1985). Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis* and *Pasteurella langaa*. *Int J Syst Bacteriol* 35, 309-322.
- Risco, D., Fernández-Llario, P., Cuesta, J.M., García-Jiménez, W.L., Gil, M., Gonçalves, P., Martínez, R., Gómez, L., García, A., Rey, J., Hermoso de Mendoza, M., Hermoso de Mendoza, J.H. (2013). Fatal outbreak of systemic pasteurellosis in a wild boar (*Sus scrofa*) population from southwest Spain. *J Vet Diagn Invest* 25, 791-794.
- Shivachandra, S.B., Viswas, K.N., Kumar, A.A. (2011). A review of hemorrhagic septicemia in cattle and buffalo. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases* 12, 67-82.
- Soike, D., Schulze, C., Kutzer, P., Ewert, B., van der Grinten, E., Schliephake, A., Ewers, C., Bethe, A., Rau, J. (2012). Acute pasteurellosis in fallow deer, cattle and pigs in a region of Eastern Germany. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 125, 122-128.
- Townsend, K.M., Boyce, J.D., Chung, J.Y., Frost, A.J., Adler, B. (2001). Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J Clin Microbiol* 39, 924-929.
- Townsend, K.M., Frost, A.J., Lee, C.W., Papadimitriou, J.M., Dawkins, H.J.S. (1998a). Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J Clin Microbiol* 36, 1096-1100.

- Townsend, K.M., O'Boyle, D., Phan, T.T., Hanh, T.X., Wijewardana, T.G., Wilkie, I., Trung, N.T., Frost, A.J. (1998b). Acute septicaemic pasteurellosis in Vietnamese pigs. *Vet Microbiol* 63, 205-215.
- Ujvári, B., Szeredi, L., Pertl, L., Tóth, G., Erdélyi, K., Jánosi, S., Molnár, T., Magyar, T. (2015). First detection of *Pasteurella multocida* type B:2 in Hungary associated with systemic pasteurellosis in backyard pigs. *Acta Vet Hung* 63, 141-156.
- Verma, N.D. (1988). *Pasteurella multocida* B:2 in haemorrhagic septicaemia outbreak in pigs in India. *Vet Rec* 123, 63.
- Volker, I., Kehler, W., Hewicker-Trautwein, M., Seehusen, F., Verspohl, J., Bilk, S., Baumgartner, W. (2014). Re-emergence of haemorrhagic septicaemia in ungulates in Lower-Saxony in Germany. *Vet Rec* 175, 460.

Estudio 3

Objetivo 4

Estudio 3: “Virulence associated genes in type B *Pasteurella multocida* isolates from free-range swine and cattle in Spain”.

Objetivo 4: Determinación de los factores de virulencia asociados a las cepas de *P. multocida* tipo B aisladas en España

***Virulence associated genes in type B Pasteurella multocida isolates from
free-range swine and cattle in Spain***

Inmaculada Cuevas^a, Alfonso Carbonero ^a, David Cano ^a, Ignacio García-Bocanegra ^a,
Carmen Borge ^a.

^a*Animal Health Department (AGR-149)., Veterinary Faculty, University of Cordoba.
Campus of Rabanales, 14071, Cordoba, Spain ‘International Excellence Agrifood
Campus, CeIA3’.*

Abstract

This paper reports the frequency and relationship of fourteen virulence associated genes of *Pasteurella multocida* strains belonging to several outbreaks of haemorrhagic septicaemia in pigs and cattle. Fifty-nine isolates were subjected to phenotypic and biochemical identification and were further confirmed by a specie specific PCR. The virulence associated genes (*ompH*, *oma87*, *psl*, *pfhA*, *ptfA*, *nanH*, *nanB*, *sodA*, *sodC*, *hgbA*, *hgbB*, *tbpA*, *exbBD-tonB* and *toxA*) were determined by different simple and multiplex PCRs. As might be expected due to the nature of this disease, all isolates belonged to capsular type B. Ten out of fourteen virulence related genes were found in the isolates analysed. There was no presence of *sodA*, *hgbB*, *tbpA* and *toxA* genes in any of them. All *P. multocida* isolates type B harboured *pfhA* gene while none of them harboured *hgbB* gene. The presence of *pfhA* gene is related to type B regardless of the clinical condition of the animal. The absence of *tbpA* gene is commonly accepted in swine isolates of *P. multocida*, because it is related to ruminant isolates. This study shows the first time that *tbpA* gene is not present in cattle isolates of *P. multocida* type B.

Keywords: *Pasteurella multocida*, type B, virulence genes.

Introduction

Pasteurella multocida affects both domestic and wild animal species and is found in the upper respiratory tract. This pathogen is the etiological cause of numerous, economically important diseases in a wide range of hosts worldwide (*Harper et al.*, 2006). *Pasteurella multocida* is the causative agent of several diseases including enzootic bronchopneumonia in cattle, sheep, goat and pigs, haemorrhagic septicaemia (HS) in cattle and buffalo, atrophic rhinitis in swine, snuffles in rabbits and fowl cholera in poultry (*De Alwis*, 1992; *Ewers et al.*, 2004; *Glimour*, 1978; *Rimler and Brogden*, 1986). Moreover, *P. multocida* has been found in the respiratory tract of apparently healthy animals (*Verma et al.*, 2013).

The septicaemia caused by *P. multocida* is designated as HS, an acute disease caused by serogroups B and E that affects cattle and buffalo (*De Alwis*, 1992). Haemorrhagic septicaemia in pigs is infrequently reported compared to bronchopneumonia and atrophic rhinitis; however, sporadic outbreaks caused by *P. multocida* type B have been reported affecting pigs in limited geographic areas of the world, such as India (*Verma*, 1988), Sri Lanka (*Gamage et al.*, 1995), Vietnam (*Townsend et al.*, 1998b) and Australia (*Mackie*, 1996). Recently, sporadic outbreaks of HS have been reported in pigs and cattle in Europe, including Spain (*Borge et al.*, 2011; *Cardoso-Toset et al.*, 2013; *Cuevas et al.*, 2016; *Magyar et al.*, 2017; *Soike et al.*, 2012; *Ujvári et al.*, 2015). It has been suggested that pigs may act as reservoir of *P. multocida* for transmission of the disease between pigs and cattle (*Verma*, 1988).

Pasteurella multocida is a heterogeneous species, which is classified in three subspecies (*multocida*, *gallicida* and *septica*) (Mutters *et al.*, 1985). Furthermore, strains of *P. multocida* are classified into five capsular serogroups (A, B, D, E, and F) based on their capsule antigens. Based on lipopolysaccharide antigens, *P. multocida* is classified into 16 serotypes (1-16) (Harper *et al.*, 2006). In addition, 13 biovars (1-10 and 12-14) are described according to the pattern of use of different sugars and enzymes (Blackall *et al.*, 1997; Fegan *et al.*, 1995).

Several genes are involved in *P. multocida* virulence (Harper *et al.*, 2006), such as dermonecrotic toxin (*toxA* gene), whose involvement in the development of progressive atrophic rhinitis has been fully demonstrated. Other proteins involved in the virulence of *P. multocida* include outer membrane proteins (OmpH, Oma87, Psl), adhesins (PfhA, PtfA), sialidases (NanH, NanB), superoxide dismutases (SodA, SodC) or proteins related with iron metabolism (HgbA, HgbB, TpbA, TonB-complex) (Ewers *et al.*, 2006).

Despite economic losses caused by *P. multocida* infections, the relationship between virulence genes and capsular type or hosts are little known. Several authors have studied the virulence associated genes in the capsular types A and D of *P. multocida* (Ewers *et al.*, 2006; Furian *et al.*, 2016; García, 2010; Sarangi *et al.*, 2015; Shirzad Aski and Tabatabaei, 2016; Verma *et al.*, 2013). However, there limited information about the prevalence of virulence associated genes in the capsular type B of *P. multocida*. The aim of the present study was to characterise *P. multocida* isolates obtained from pigs or cattle with acute septicaemic pasteurellosis in Spain to determine the prevalence of virulence

associated genes of the capsular type B as well as the association between virulence genes.

Materials and methods

Biological material

Pasteurella multocida isolates (n=59) from free-range animals affected by acute septicaemic processes between 2009 and 2015 were investigated. Forty-one isolates belonged to swine and 18 to cattle. Specifically, the study assessed 18 isolates from lung, 10 from lymph nodes, 8 from spleen, 5 from liver, 5 from joints, 5 from oedema of different locations, 4 from kidney, 3 from heart and 1 from thymus.

Identification

The isolates, which grew in pure cultures, morphologically and biochemically compatible with *P. multocida* were screened for the study. Samples were plated on blood agar (Oxoid) supplemented by 5% of defibrinated sheep blood and MacConkey agar (Oxoid) and incubated at 37 °C for 24h under microaerobic conditions. Hypothetical identification as *P. multocida* was accomplished by phenotypic identification, oxidase and catalase tests. The identification was further confirmed by detection of KMT1 gene through a species-specific PCR assay (Townsend et al., 1998a). The biovar was determined by assessment of the presence of ornithine decarboxylase (ODC) enzyme, urease activity and fermentation of seven carbohydrates: dulcitol, sorbitol, lactose, maltose, arabinose, xylose and trehalose (Blackall et al., 1997; Fegan et al., 1995). After

identification, isolates were preserved using a cryopreservation system, Maintenance Freeze Medium (Oxoid). Additionally, *P. multocida* reference strains NCTC 43137 (capA), CECT 962 (capB), CECT 4325 (capD), CECT 902 (capE), NCTC 103226 (capF) were included as positive control for the indicated genes.

PCR analyses and gel electrophoresis

The genomic DNA for PCR analysis was extracted from pure cultures by a boiling procedure and was stored at -20 °C until use. The molecular characterization of the *P. multocida* serogroups was carried out by a multiplex PCR using specific primers pair for different capsular antigens (capA, capB, capD, capE and capF) (Townsend *et al.*, 2001).

Fourteen virulence associated genes (*ompH*, *oma87*, *psl*, *pfhA*, *ptfA*, *exbBD-tonB*, *hgbA*, *hgbB*, *tbpA*, *nanH*, *nanB*, *sodA*, *sodC*, and *toxA*) were investigated. To determine the presence of these genes, *P. multocida* isolates were subjected to different simple and multiplex PCRs. The sequence primers for partial amplification of the virulence associated genes as well as the PCR mixtures and conditions were used according with previous authors (Davies *et al.*, 2003; Doughty *et al.*, 2000; Ewers *et al.*, 2006; Lainson *et al.*, 1996; Ogunnariwo and Schryvers, 2001; Shirzad Aski and Tabatabaei, 2016; Tang *et al.*, 2009). Primers used for the detection of the virulence associated genes and their amplicon size (bp) are listed in Table 1. Amplification reactions were performed in a *Mastercycler Gradient thermocycler* (Eppendorf) and PCR products were analysed by gel electrophoresis on a 1% agarose gel, stained with *RedSafe TM* (INTRON Biotechnology®) and photographed at UV exposure.

Statistical analyses

Descriptive statistics were used to calculate the absolute and relative frequencies of the virulence associated genes. *Chi-square* and *Fisher's exact test* were used to determine the association between genes. Statistical analyses were performed using *SPSS v25.0*. software for *Windows*.

Table 1. Details of sequence and product size of primers used for the detection of virulence associated genes in *P. multocida* strains

Proteins	Gene	Primer	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)	Reference
	<i>KMT1^a</i>	KMT1T7	ATCCGCTATTTACCCAGTGG	460	Townsend et al. (1998)
		KMT1SP6	GCTGTAAACGAACTCGCCAC		
Capsular antigens	<i>hyaD-hyaC</i>	capA-F	TGCCAAAATCGCAGTGAG	1044	Townsend et al. (2001)
		capA-R	TGCCATCATTGTCAGTG		
	<i>bcbD</i>	capB-F	CATTTATCCAAGCTCCACC	760	Townsend et al. (2001)
		capB-R	GCCCGAGAGTTTCAATCC		
	<i>dcbF</i>	capD-F	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC	657	Townsend et al. (2001)
		capD-R	CATCTACCCACTCAACCATATCAG		
	<i>ecbJ</i>	capE-F	TCCGCAGAAAATTATTGACTC	511	Townsend et al. (2001)
		capE-R	GCTTGCTGCTTGATTTTGTC		
	<i>fc bD</i>	capF-F	AATCGGAGAACGCAGAAATCAG	851	Townsend et al. (2001)
		capF-R	TTCCGCCGTCAATTACTCTG		

^a Specific gene for *P. multocida* identification.

Proteins	Gene	Primer	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)	Reference
Outer membrane proteins	<i>ompH</i>	OmpH-F	CGCGTATGAAGGTTTAGGT	438	Ewers et al. (2006)
		OmpH-R	TTTAGATTGTGCGTAGTCAAC		
	<i>oma87</i>	Oma87-F	ATGAAAAAACTTTTAATTGCGAGC	948	Ewers et al. (2006)
		Oma87-R	TGACTTGCGCAGTTGCATAAC		
Adhesins	<i>psl</i>	P6-F	TCTGGATCCATGAAAACTAACTAAAGTA	439	Ewers et al. (2006)
		P6-R	AAGGATCCTTAGTATGCTAACACAGGACGACG		
	<i>pfhA</i>	Pfha-F	AGCTGATCAAGTGGTGAAC	275	Ewers et al. (2006)
		Pfha-R	TGGTACATTGGTGAATGCTG		
	<i>ptfA</i>	Fim4-F	TGTGGAATTCAGCATTCTTAGTGTGTC	488	Doughty et al. (2000)
		Fim4-R	TCATGAATTCTTATGCGCAAAA		
Sialidases	<i>nanH</i>	NanH-F	ATCCGCTATTTACCCAGTGG	360	Ewers et al. (2006)
		NanH-R	GCTGTAAACGAACTCGCCAC		
	<i>nanB</i>	NanB-F	GTCCTATAAAGTGACGCCGA	584	Ewers et al. (2006)
		NanB-R	ACAGCAAAGGAAGACTGTCC		
Superoxide dismutases	<i>sodA</i>	SodA-F	TACCAGAATTAGGCTACGC	361	Lainson et al. (1996)
		SodA-R	GAAACGGGTTGCTGCCGCT		
	<i>sodC</i>	SodC-F	AGTTAGTAGCGGGGTTGGCA	235	Lainson et al. (1996)
		SodC-R	TGGTGCTGGGTGATCATCATG		
Iron metabolism	<i>hgbA</i>	hgbA-F	TGGCGGATAGTCATCAAG	419	Ewers et al. (2006)
		hgbA-R	CCAAAGAACCACTACCCA		
	<i>hgbB</i>	hgbB-F	ACCGCGTTGGAATTATGATTG	788	Ewers et al. (2006)
		hgbB-R	CATTGAGTACGGCTTGACAT		
	<i>tbPA</i>	tbPA-F	TTGGTTGGAACGGTAAAGC	728	Ogunnariwo and Schryvers (2001)
		tbPA-R	TAACGTGTACGGAAAAGCCC		
	<i>exbBD-tonB</i>	ExbB-F	GGTGGTGATATTGATGCGGC	1144	Ewers et al. (2006)
		TonB-R	GCATCATGCGTGACGGTT		

Proteins	Gene	Primer	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)	Reference
Dermo necrotic toxin	<i>toxA</i>	TOX-F	CGTGAAGTGCCTACTCAA	1854	Davies et al. (2003)
		TOX-R	AAGAGGAGGCATGAAGAG		

Results

Isolates investigated (n=59) were isolated from different organic locations of swine (41/59) and cattle (18/59) reared in free-range systems, which died because of acute septicaemic pasteurellosis. All isolates showed the same colony morphology typical of *P. multocida* (Gram-negative coccobacilli) and were positive to catalase and oxidase tests, giving the amplification product of 460 bp expected in the species-specific PCR assay. All isolates resulted in the amplification of a single band (760 bp) representing capsular type B. According to the carbohydrate fermentation pattern and presence of urease and ODC, all isolates of this study belonged to biovar 3.

Absolute and relative frequencies of the 14 virulence associated genes were defined among the total number of *P. multocida* isolates as well as among the number of strains of each species (Table 2). OmpH, Oma87 and Psl (P6) are outer membrane proteins (OMP) encoded by *ompH*, *oma87* and *psl* genes, respectively. In this study, *ompH* gene was present in all *P. multocida* isolates from swine and 94.4% of bovine isolates. A prevalence of 94.4% was found of *oma87* gene in bovine isolates while only 43.9% of swine isolates harboured it. Regarding *psl* gene, 97.6% of swine isolates and 100% of bovine isolates harboured it. The filamentous hemagglutinin, encoded by *pfhA* gene, was found

in all isolates from pigs and cattle in this study. Type 4 fimbriae (PtfA), encoded by *ptfA* gene, was detected in 80.5% of swine isolates and 72.2% of bovine isolates.

Table 2. Absolute and relative frequencies (%) of 14 virulence associated genes detected by PCR in *P. multocida* type B isolates from swine and cattle

Proteins	Gene	Swine (n=41)	Bovine (n=18)	Total (n=59)
Outer membrane protein	<i>ompH</i>	41 (100%)	17 (94.4%)	58 (98.3%)
	<i>oma87</i>	18 (43.9%)	17 (94.4%)	35 (59.3%)
	<i>psl</i>	40 (97.6%)	18 (100%)	58 (98.3%)
Adhesins	<i>pfhA</i>	41 (100%)	18 (100%)	59 (100%)
	<i>ptfA</i>	33 (80.5%)	13 (72.2%)	46 (78%)
Sialidases	<i>nanH</i>	41 (100%)	18 (100%)	59 (100%)
	<i>nanB</i>	35 (85.4%)	17 (94.4%)	52 (88.1%)
Superoxide dismutases	<i>sodA</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	<i>sodC</i>	41 (100%)	18 (100%)	59 (100%)
Iron metabolism	<i>hgbA</i>	37 (90.2%)	18 (100%)	55 (93.2%)
	<i>hgbB</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	<i>tbPA</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	<i>exbBD-tonB</i>	14 (37.8%)	17 (94.4%)	31 (56.4%)
Dermonecrotic toxin	<i>toxA</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Sialidases are encoded by *nanH* and *nanB* genes. In this study, all our isolates from both host species harboured *nanH* gene while *nanB* gene was detected 85.4% of swine isolates and 94.4% of bovine isolates. The genes *sodA* and *sodC* encode superoxide dismutase proteins. While *sodC* gene was present in all isolates from pigs and cattle in this study, any of them harboured *sodA* gene.

Regarding the genes related with iron metabolism, *hgbA* gene was detected in 90.2% of swine isolates and 100% of bovine isolate. In contrast, *hgbB* gene was not present in any of the isolates from either host species. None of the isolates of this study harboured *tbpA* gene, which encodes transferrin binding protein (TbpA). The ExbB-ExbD-TonB complex was present in 37.8% and 94% of isolates from swine and bovine, respectively. Finally, *toxA* gene was not present in any of the isolates studied in both host species.

The relationship between virulence associated genes of *P. multocida* type B was assessed by *Chi-square* and *Fisher's exact test*. Associations were present between *oma87-nanB* ($p \leq 0.05$), *oma87-exbBDtonB* ($p \leq 0.01$) and *nanB-exbBDtonB* ($p \leq 0.05$) genes as indicated in Table 3. Considering the relationship between genes in each host species, only an association between *oma87-exbBDtonB* ($p \leq 0.01$) genes was found in swine, while in cattle a tendency ($p = 0.056$) between *oma87-nanB*, *oma87-exbBDtonB* and *nanB-exbBDtonB* genes was found (Table 4).

Table 3. Percentage of *P. multocida* isolates harbouring pair of virulence associated genes among the total of strains

	<i>ompH</i>	<i>oma87</i>	<i>psl</i>	<i>pfhA</i>	<i>ptfA</i>	<i>nanH</i>	<i>nanB</i>	<i>sodA</i>	<i>sodC</i>	<i>hgbA</i>	<i>hgbB</i>	<i>tbpA</i>	<i>exbBD-tonB</i>
<i>oma87</i>	57.6	-											
<i>psl</i>	96.6	59.3	-										
<i>pfhA</i>	98.3	59.3	98.3	-									
<i>ptfA</i>	78	47.5	78	78	-								
<i>nanH</i>	98.3	59.3	98.3	100	78	-							
<i>nanB</i>	86.4	57.6 ^a	88.1	88.1	71.2	88.1	-						
<i>sodA</i>	0	0	0	0	0	0	0	-					
<i>sodC</i>	98.3	59.3	98.3	100	78	100	88.1	0	-				
<i>hgbA</i>	91.5	52.4	91.5	93.2	71.2	93.2	81.4	0	93.2	-			
<i>hgbB</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-		
<i>tbpA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
<i>exbBD-tonB</i>	54.5	56.4 ^b	56.4	56.4	43.6	56.4	56.4 ^a	0	56.4	50.9	0	0	-
<i>toxA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

The percentage of isolates harbouring both genes is indicated.

^a $p \leq 0.05$

^b $p \leq 0.01$

Table 4. Two-tailed significance level between virulence associated genes in *P. multocida* type B isolated by host species

	Swine (n=41)	Bovine (n=18)
<i>ompH-oma87</i>	– ^a	1.000
<i>ompH-psl</i>	– ^a	– ^a
<i>ompH-ptfA</i>	– ^a	0.278
<i>ompH-nanB</i>	– ^a	1.000
<i>ompH-hgbA</i>	– ^a	– ^a
<i>ompH-exbBDtonB</i>	– ^a	1.000
<i>oma87-psl</i>	1.000	– ^a
<i>oma87-ptfA</i>	1.000	0.278
<i>oma87-nanB</i>	0.205	0.056 ^b
<i>oma87-hgbA</i>	0.303	– ^a
<i>oma87-exbBDtonB</i>	0.000	0.056 ^b
<i>psl-ptfA</i>	0.195	– ^a
<i>psl-nanB</i>	0.146	– ^a
<i>psl-hgbA</i>	1.000	– ^a
<i>psl-exbBDtonB</i>	1.000	– ^a
<i>nanB-hgbA</i>	1.000	– ^a
<i>nanB-exbBDtonB</i>	0.135	0.056 ^b
<i>hgbA-exbBDtonB</i>	0.142	– ^a

Standard type: non-significant associations ($p > 0.05$). Bold type: significant associations ($p \leq 0.01$).

^a Calculation of significance not indicated, as at least one of the genes was constantly present in all strains.

^b Statistical trend ($p < 0.06$).

Discussion

This study reported the prevalence of fourteen virulence associated genes of *P. multocida* type B isolates from swine and cattle as well as the relationship between these genes. The increasing description of HS outbreaks in Europe (Borge et al., 2011; Cardoso-Toset et al., 2013; Cuevas et al., 2016; Magyar et al., 2017; Soike et al., 2012; Ujvári et al., 2015) make it necessary to deepen understanding in their causative agent, *P. multocida* type B, for the control of this emergent disease. The virulence factors play an important role in the colonization and establishment of *P. multocida* into the host. Identifying virulence associated genes of *P. multocida* enhance understanding of its mechanisms of pathogenesis, which enable the control of this pathogen. However, to the best of our knowledge, there are no studies investigating the distribution and frequency

of virulence associated genes in the capsular type B of *P. multocida* in European isolates, and they are scarce in other continents (Table 5).

As could be expected, all isolates of this study were classified as capsular type B of *P. multocida*, the capsular type related with HS (De Alwis, 1992). The OMP are involved in the transport of molecules or nutrient absorption between the pathogen and the host (Verma *et al.*, 2013). In this study, the high prevalence of *ompH* and *psl* gene are in agreement with the results obtained in the capsular types A and D of *P. multocida* from pigs (Ewers *et al.*, 2006; Furian *et al.*, 2016; García, 2010) and type B from small ruminants (Shirzad Aski and Tabatabaei, 2016), which suggest their significant role in the interaction with different hosts species regardless the capsular type. According to previous authors, who detected *oma87* gene in all isolates from diseased cattle (Verma *et al.*, 2013), a high prevalence of this gene (94.4%) was found in capsular type B of bovine isolates in this study. In contrast, a lower frequency of *oma87* gene was detected in the capsular type B isolates from pigs in this study (43.9%) compared to its frequency in isolates of capsular type A and D (100%) belonging to swine in previous studies (Ewers *et al.*, 2006; Furian *et al.*, 2016; García, 2010).

Table 5. Frequencies of virulence associated genes of *P. multocida* type B in previous studies (%)

HOST SPECIES	CAPSULAR TYPE	AUTHORS	n	Outer membrane proteins			Adhesins		Sialidases		Superoxide dismutases		Iron metabolism			D. toxin	
				<i>ompH</i>	<i>oma87</i>	<i>psl</i>	<i>pfhA</i>	<i>ptfA</i>	<i>nanH</i>	<i>nanB</i>	<i>sodA</i>	<i>sodC</i>	<i>hgbA</i>	<i>hgbB</i>	<i>tonB</i>	<i>tbpA</i>	<i>toxA</i>
Swine	B	This study	41	100	43.9	97.6	100	80.5	100	85.4	0	100	90.2	0	37.8	0	0
Swine	A, D	Ewers et al. (2006)	52	100	100	100	21.2	100	98.1	100	100	100	98.1	86.5	100	0	36.5
Swine	A, D	García, (2010)	200	100	100	100	0-100 ^a	100	100	100	100	100	100	0-100 ^b	100	0	7.8%
Swine	A, D	Furian et al. (2016)	40	98	100	98	53	98	85	100	100	100	92	58	98	Nd	3
Cattle	B	This study	18	94.4	94.4	100	100	72.2	100	94.4	0	100	100	0	94.4	0	0
Cattle	B	Verma et al. (2013)	19	Nd	94.74	Nd	100	89.47	100	0	39.84	100	100	15.79	Nd	100	0
Small rum.	B	Sarangi et al. (2015)	12	Nd	100	Nd	100	100	75	100	100	100	91.7	66.7	100	83.3	8.3
Small rum.	B	Shirzad et al. (2016)	10	100	100	Nd	50	100	60	70	100	100	90	70	90	80	Nd

Nd: not determined.

^a *pfhA* gene: 0% biovar 3, capsular type A or D. 100% biovar 2, capsular type A.^b *hgbB* gene: 100% biovar 3, capsular type A or D. 0% biovar 2, capsular type A

The virulence factors involved in bacterial adhesion play an important role in initial colonization of *P. multocida*, interfering in the cell surface adhesion (Harper *et al.*, 2006). This is reflected in the high prevalence of adhesins found in the isolates of this study. In that respect, *pfhA* gene was detected in all capsular type B isolates from both host species. The presence of *pfhA* gene has been associated with HS by previous authors (Ewers *et al.*, 2006). However, other authors reported a high prevalence of *pfhA* gene in capsular type B from not only sick animals but apparently health animals (Sarangi *et al.*, 2015; Shirzad Aski and Tabatabaei, 2016; Verma *et al.*, 2013). This might mean that *pfhA* gene is related to the capsular type B of *P. multocida* regardless of the clinical condition. Furthermore, previous authors associated this gene with biovar 2 of capsular type A isolates from swine as they found *pfhA* gene in all isolates from capsular type A belonging to biovar 2, but it was not found in capsular types A and D belonging to biovar 3 (García *et al.*, 2011). This is in contrast with the results of the present study due to all isolates of this study belonged to biovar 3 and all of them harboured *pfhA* gene. Further research is needed to understand the relationship between virulence related genes and biovars of *P. multocida* and its implication.

Sialidases may enhance *P. multocida* virulence by unmasking key host receptors and/or reducing the effectiveness of host defences such as mucin (Mizan *et al.*, 2000). The high prevalence of both sialidases in the isolates of this study is in agreement with previous authors, who found from 85 to 100% of their swine isolates with presence of *nanH* gene and 100% with presence of *nanB* gene (Ewers *et al.*, 2006; Furian *et al.*, 2016; García, 2010). Lower frequencies of both

genes were reported in capsular type B from small ruminants in previous studies (Sarangi *et al.*, 2015; Shirzad Aski and Tabatabaei, 2016). These results suggest that most of the *P. multocida* isolates infecting pigs and cattle harbour both sialidases and this facilitates the ability of *P. multocida* to colonize these species.

Superoxide dismutases promote bacterial survival through modulation of the superoxide and hydrogen peroxide concentrations (Lainson *et al.*, 1996). The gene *sodC* was present in all capsular type B isolates from pigs and cattle in this study while none of them harboured *sodA* gene. Low frequencies of *sodA* gene (39.84%) have been reported as well in capsular type B from cattle (Verma *et al.*, 2013). Other studies have reported the presence of both genes in all *P. multocida* isolates (Ewers *et al.*, 2006; Furian *et al.*, 2016; García, 2010; Sarangi *et al.*, 2015; Shirzad Aski and Tabatabaei, 2016).

According to the high prevalence of *hgbA* gene found in this study, regardless the host species, previous authors proved that *hgbA* gene was widespread in *P. multocida* strains regardless of the host species and capsular type A, B or D (Ewers *et al.*, 2006; García, 2010; Sarangi *et al.*, 2015; Shirzad Aski and Tabatabaei, 2016; Verma *et al.*, 2013). This suggests that *hgbA* gene might be essential for the viability of *P. multocida* as this gene is related with the acquisition of iron, which is crucial for the survival of this pathogen (Ogunnariwo and Schryvers, 2001). However, *hgbB* gene was not present in any of capsular type B isolates from either species in this study. Previous authors have suggested that *hgbB* gene might be less efficient than *hgbA* gene in the pathogenesis of *P. multocida* as its prevalence is inconstant in isolates of this

pathogen (Cope *et al.*, 2001). It should be noted that García *et al.* (2011) reported an association between *hgbB* gene and biovar 3. This is in contrast to the results from this study, given that all our isolates belonged to biovar 3 and none of them harboured *hgbB* gene. In the current study, none of the capsular type B isolates from both host species harboured *tbpA* gene. This gene has only been evidenced in ruminant isolates (Ewers *et al.*, 2006; Sarangi *et al.*, 2015; Shirzad Aski and Tabatabaei, 2016; Verma *et al.*, 2013). Interestingly, *tbpA* gene was not present in any of isolates of *P. multocida* type B from cattle in this study. Similarly to previous authors, ExbB-ExbD-TonB complex was highly present in our cattle isolates (Sarangi *et al.*, 2015; Shirzad Aski and Tabatabaei, 2016); however, only 37.8% of swine isolates harboured *tonB* gene.

Dermonecrotic toxin has not been found in *P. multocida* causing systemic pasteurellosis (Cardoso-Toset *et al.*, 2013). Accordingly, *toxA* gene was not present in any of capsular type B isolates from both species in this study.

The differences found in the association between genes depending on the host species suggest that mechanisms of pathogenesis of *P. multocida* type B, biovar 3 may differ between host species. There is limited information regarding relationship between genes. Therefore, the descriptive results of this study regarding the relationship between genes hopefully will be useful for future investigation about the pathogenesis and control of *P. multocida*.

Conclusions

The characterization of isolates from swine and cattle affected with HS revealed that *pfhA* gene could be related to the capsular type B of *P. multocida*. The presence of both sialidases facilitates the ability of *P. multocida* to colonize the hosts. The gene *hgbA* seems to be widespread in *P. multocida* strains regardless the host species and capsular type A, B or D, which suggests that *hgbA* gene might be essential for the viability of *P. multocida*. Future studies are needed to understand the relationships between genes, capsular types, biovars of *P. multocida* and host species to understand its pathogenesis and establish control measures.

Acknowledgments

The authors thank all the farmers and clinical veterinarians for providing samples of diseased animals as well as the staff of the Animal Health Department of the Córdoba University.

References

- Blackall, P.J., Pahoff, J.L., Bowles, R., 1997. Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian pigs. *Veterinary Microbiology* 57, 355-360.
- Borge, C., Barranco, I., Márquez del Cid, J.M., Rodríguez-Guerra, M.A., Carbonero, A., Carrasco, L., Perea, A., 2011. Outbreak of acute septicaemia by *Pasteurella multocida* type B in pigs reared in extensive system in Spain., In: 3rd European Symposium of Porcine Health and Management (ESPHM). Espoo, Finland, p. 127.
- Cardoso-Toset, F., Gomez-Laguna, J., Callejo, M., Vela, A.I., Carrasco, L., Fernandez-Garayzabal, J.F., Maldonado, A., Luque, I., 2013. Septicaemic pasteurellosis in free-range pigs associated with an unusual biovar 13 of *Pasteurella multocida*s. *Veterinary Microbiology* 167, 690-694.
- Cope, L.D., Love, R.P., Guinn, S.E., Gilep, A., Usanov, S., Estabrook, R.W., Hrkal, Z., Hansen, E.J., 2001. Involvement of HxuC outer membrane protein in utilization of hemoglobin by *Haemophilus influenzae*. *Infection and Immunity* 69, 2353-2363.
- Cuevas, I., Pacheco, I., Marín, J.C., Carbonero, A., Cano, D., García-Bocanegra, I., Borge, C., 2016. Brote de septicemia hemorrágica por *Pasteurella multocida* B:3 en una explotación de bovino extensivo., In: XII Congreso Internacional Anembe de Medicina Bovina., Santiago de Compostela, Spain.
- Davies, R.L., MacCorquodale, R., Baillie, S., Caffrey, B., 2003. Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. *Journal of Medical Microbiology* 52, 59-67.
- De Alwis, M.C., 1992. Haemorrhagic septicaemia--a general review. *Br Vet J* 148, 99-112.

- Doughty, S.W., Ruffolo, C.G., Adler, B., 2000. The type 4 fimbrial subunit gene of *Pasteurella multocida*. Vet Microbiol 72, 79-90.
- Ewers, C., Lubke-Becker, A., Bethe, A., Kiessling, S., Filter, M., Wieler, L.H., 2006. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. Veterinary Microbiology 114, 304-317.
- Ewers, C., Lubke-Becker, A., Wieler, L.H., 2004. Pasteurella: insights into the virulence determinants of a heterogenous bacterium. Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift 117, 367-386.
- Fegan, N., Blackall, P.J., Pahoff, J.L., 1995. Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian poultry. Veterinary Microbiology 47, 281-286.
- Furian, T.Q., Borges, K.A., Laviniki, V., Rocha, S.L., de Almeida, C.N., do Nascimento, V.P., Salle, C.T., Moraes, H.L., 2016. Virulence genes and antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolated from poultry and swine. Braz J Microbiol 47, 210-216.
- Gamage, L.N.A., Wijewardana, T.G., Bastiansz, H.L.G., Vipulasiri, A.A., 1995. An outbreak of acute pasteurellosis in swine caused by serotype B:2 in Sri Lanka. . Sri Lanka Veterinary Journal 42, 15-19.
- García, N. 2010. Caracterización fenotípica y genética de aislados de *Pasteurella multocida* obtenidos de ganado porcino., Universidad Complutense de Madrid.
- García, N., Fernández-Garayzábal, J.F., Goyache, J., Domínguez, L., Vela, A.I., 2011. Asociaciones entre los genes biovar y el factor de virulencia en aislamientos de *Pasteurella multocida* de cerdos en España Veterinary Record 169, 362-U346.
- Glimour, N.J., 1978. Pasteurellosis in sheep. The Veterinary Record 102, 100-102.

- Harper, M., Boyce, J.D., Adler, B., 2006. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. FEMS Microbiol Lett 265, 1-10.
- Lainson, F.A., Thomson, N., Rowe, H.A., Langford, P.R., Aitchison, K.D., Donachie, W., Kroll, J.S., 1996. Occurrence of [copper, zinc]-cofactored superoxide dismutase in *Pasteurella haemolytica* and its serotype distribution. FEMS Microbiol Lett 142, 11-17.
- Mackie, J.T., 1996. Haemorrhagic septicaemia in pigs. Australian Veterinary Journal 74, 399-400.
- Magyar, T., Ujvári, B., Szeredi, L., Virsinger, N., Albert, E., Német, Z., Csuka, E., Biksi, I., 2017. Re-emergence of bovine haemorrhagic septicaemia in Hungary. Acta Vet Hung 65, 41-49.
- Mizan, S., Henk, A., Stallings, A., Maier, M., Lee, M.D., 2000. Cloning and characterization of sialidases with 2-6 ' and 2-3 ' sialyl lactose specificity from *Pasteurella multocida*. Journal of Bacteriology 182, 6874-6883.
- Mutters, R., Ihm, P., Pohl, S., Frederiksen, W., Mannheim, W., 1985. Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis* and *Pasteurella langaa*. International Journal of Systematic Bacteriology 35, 309-322.
- Ogunnariwo, J.A., Schryvers, A.B., 2001. Characterization of a novel transferrin receptor in bovine strains of *Pasteurella multocida*. Journal of Bacteriology 183, 890-896.
- Rimler, R.B., Brogden, K.A., 1986. *Pasteurella multocida* isolated from rabbits and swine: serologic types and toxin production. American Journal of Veterinary Research 47, 730-737.

- Sarangi, L.N., Thomas, P., Gupta, S.K., Priyadarshini, A., Kumar, S., Nagaleekar, V.K., Kumar, A., Singh, V.P., 2015. Virulence gene profiling and antibiotic resistance pattern of Indian isolates of *Pasteurella multocida* of small ruminant origin. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 38, 33-39.
- Shirzad Aski, H., Tabatabaei, M., 2016. Occurrence of virulence-associated genes in *Pasteurella multocida* isolates obtained from different hosts. *Microb Pathog* 96, 52-57.
- Soike, D., Schulze, C., Kutzer, P., Ewert, B., van der Grinten, E., Schliephake, A., Ewers, C., Bethe, A., Rau, J., 2012. Acute pasteurellosis in fallow deer, cattle and pigs in a region of Eastern Germany. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 125, 122-128.
- Tang, X., Zhao, Z., Hu, J., Wu, B., Cai, X., He, Q., Chen, H., 2009. Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China. *J Clin Microbiol* 47, 951-958.
- Townsend, K.M., Boyce, J.D., Chung, J.Y., Frost, A.J., Adler, B., 2001. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 924-929.
- Townsend, K.M., Frost, A.J., Lee, C.W., Papadimitriou, J.M., Dawkins, H.J., 1998a. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J Clin Microbiol* 36, 1096-1100.
- Townsend, K.M., O'Boyle, D., Phan, T.T., Hanh, T.X., Wijewardana, T.G., Wilkie, I., Trung, N.T., Frost, A.J., 1998b. Acute septicaemic pasteurellosis in Vietnamese pigs. *Veterinary Microbiology* 63, 205-215.

Ujvári, B., Szeredi, L., Pertl, L., Tóth, G., Erdélyi, K., Jánosi, S., Molnár, T., Magyar, T., 2015. First detection of *Pasteurella multocida* type B:2 in Hungary associated with systemic pasteurellosis in backyard pigs. Acta Vet Hung 63, 141-156.

Verma, N.D., 1988. *Pasteurella multocida* B:2 in haemorrhagic septicaemia outbreak in pigs in India. Vet Rec 123, 63.

Verma, S., Sharma, M., Katoch, S., Verma, L., Kumar, S., Dogra, V., Chahota, R., Dhar, P., Singh, G., 2013. Profiling of virulence associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cattle. Vet Res Commun 37, 83-89.

Estudio 4

Objetivo 3

**Estudio 4: “Optimización en la aplicación de la espectrometría de masas
Maldi-Tof para la identificación de microorganismos patógenos”**

Objetivo 3: Caracterización bioquímica y molecular de los aislados de
P. multocida tipo B procedentes de España.

Resumen

Uno de los principales objetivos de los laboratorios de microbiología es poder realizar una correcta identificación bacteriana de forma rápida. Generalmente, los métodos convencionales de identificación de microorganismos son un proceso largo y tedioso que requieren entre 24 y 72 horas, pero en los últimos años los laboratorios de microbiología han comenzado a usar herramientas como la espectrometría de masas MALDI-TOF que parece representar una alternativa prometedora a los diagnósticos fenotípicos engorrosos que se realizan actualmente en muchos laboratorios de diagnóstico.

Nuestro trabajo de investigación es un inicio al estudio de los microorganismos de relevancia tanto clínica como comensal, mediante esta novedosa tecnología. Hemos comparado tres métodos de preparación de las muestras, confirmando que el tratamiento con ácido fórmico y la extracción de proteínas mejoran de forma significativa los resultados de identificación obtenidos respecto al método de transferencia directa.

Hemos probado su potencial diagnóstico con aislamientos de campo bien caracterizados pudiendo comprobar una gran discriminación a nivel de género y de especie, confirmando que MALDI-TOF MS representaba un método muy potente para el diagnóstico de los patógenos animales estudiados, que combina rapidez, precisión y bajos costes de funcionamiento.

Palabras clave: *P. multocida*, type B, Maldi Tof, espectrometría de masas

1. Introducción

Actualmente las enfermedades infecciosas siguen siendo la causa de numerosos procesos que cursan con elevadas tasas de morbilidad y letalidad en los animales, muchas de ellas de carácter zoonótico, siendo fundamental la puesta en marcha de medidas de control específicas y adecuadas a cada caso de forma ágil y rápida. Para ello, es indispensable realizar un óptimo diagnóstico, incluyendo la identificación microbiológica del agente causal, en el menor espacio de tiempo posible, optimizando la aplicación de un tratamiento antibiótico específico, reduciendo el tratamiento administrado empíricamente y contribuyendo a la disminución de las resistencias frente a los antimicrobianos (Collignon, P.J. *et al.*, 2002).

Muchos de estos cuadros tienen en común la intervención en su etiología de alguna especie perteneciente al género *Pasteurella*, bien como causa única o bien como agentes secundarios. A la mayoría de estos procesos, en los que estas bacterias intervienen como causa primaria se les conoce con el nombre genérico de “pasteurelosis”.

La caracterización completa de los aislados de *P. multocida* es compleja pues este microorganismo presenta una gran heterogeneidad antigénica. Concretamente *Pasteurella multocida* incluye 3 subespecies: *P. multocida* subsp *multocida*, *P. multocida* subsp *séptica* y *P. multocida* subsp *gallicida* (Olsen, I. *et al.*, 2005). Además se clasifica en cinco tipos capsulares (A, B, D, E y F), trece biovars (1-13) y dieciséis serotipos (1-16), estos últimos determinados en base a su antígeno somático que, al contrario que los antígenos capsulares, no son

determinantes de grupo, puesto que cualquiera de ellos puede combinarse con uno o con más antígenos capsulares (Wilson, B.A. et al., 2013).

La importancia de identificar la naturaleza antigénica de las cepas radica en que cada una de las serovariedades puede mostrar distinta virulencia, las especies animales susceptibles pueden ser diferentes y pueden realizar su acción patógena en distintas partes del organismo.

Para llevar a cabo la tipificación de este microorganismo se utilizan métodos convencionales de identificación que requieren una serie de pruebas que pueden realizarse de manera tradicional o mediante el uso de sistemas comerciales, como pueden ser las galerías multisustrato API 20NE y API20E (Biomérieux) (Rimler R.B. et al., 1989).

Respecto a la determinación de los biovares, ésta se realiza mediante la determinación de la fermentación de una batería de azúcares: arabinosa, dulcitol, maltosa, sorbitol, trehalosa, xilosa y lactosa. Además incluye determinación de la reacción a la ureasa y a la ornitina descarboxilasa (Backlall, P.J et al., 1997).

Esta identificación fenotípica, basada en esquemas simplificados y económicos, se aplica normalmente en los diagnósticos rutinarios pero son técnicas que requieren un tiempo mínimo para el cultivo y obtención del antibiograma o de marcadores para su identificación, tiempo que puede variar entre 24 y 72 horas (Jordana-Lluch, E. et al., 2012).

Si bien la simplificación del laboratorio de microbiología resulta compleja, podríamos decir que los requisitos ideales en una plataforma o equipo de detección o de identificación microbiológica serían: capacidad de detección de cualquier microorganismo, detección a partir de la muestra clínica directa, obtención de resultados en un periodo corto de tiempo (1-6 horas), detección de resistencias, factores de virulencia o toxinas y una buena relación coste-efectividad (Bou, G. et al., 2011).

En este sentido, la espectrometría de masas MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry), se ha incorporado recientemente en el laboratorio de microbiología, demostrando ser un método rápido y preciso para la identificación bacteriana. El uso de la espectrometría de masas para la identificación de microorganismos fue desarrollado en 1975 por Anhalt con algunas limitaciones, pues entonces no era posible el análisis de las proteínas intactas de las bacterias debido a que estas se fragmentaban durante el proceso.

Las plataformas comercializadas hasta el momento utilizan la espectrometría de masas para la identificación de microorganismos mediante dos aproximaciones diferentes: la identificación basada en el perfil proteico específico de cada microorganismo (aproximación proteómica) o el análisis de sus ácidos nucleicos (aproximación genómica) (Jordana-Lluch, E. et al., 2012).

Actualmente existen dos sistemas que desarrollan esta tecnología, VITEK® MS (bioMérieux Inc.) y el Bruker Daltonik MALDI Biotyper®. Aunque cada uno incluye un espectrómetro de masas, software y base de datos, estos tres

componentes, incluida la lista de microorganismos autorizado para su identificación, son exclusivos de cada sistema (Patel, R. et al., 2015).

Uno de los componentes más importante del rendimiento para la identificación del microorganismo es la calidad de la base de datos. Mientras VITEK MS V2.0 incluye 1.316 especies con una media de doce cepas por especie, Bruker MALDI Biotyper identifica 2.700 especies, incluyendo bacterias gram-positivas y gram-negativas y levaduras. El sistema de Bruker Biotyper® es el más estudiado en términos de publicaciones y evaluaciones en múltiples laboratorios (Doern, C.D. et al., 2016).

La espectrometría de masas es una técnica que analiza con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos midiendo los iones procedentes de moléculas que se separan en función de su relación masa/ carga (m/z) (Anhalt, J.P. et al., 1975). Un ión es un átomo o molécula cargada eléctricamente debido al exceso o falta de electrones. Dado que la mayoría de los iones formados poseen una sola carga, la relación m/z es equivalente a m . Por lo tanto, la espectrometría de masas es una técnica de determinación estructural que permite establecer la distribución de las moléculas de una sustancia en función de su masa. Los tres componentes básicos de un espectrómetro de masas son los siguientes:

1. **Fuente de ionización:** es el elemento que ioniza el material que va a ser analizado a través de pulsos cortos de láser que vaporiza el microorganismo junto con la matriz, produciéndose la desorción de ambos.

La mayor parte de la energía generada es absorbida por la matriz, dando lugar a la ionización de las proteínas ribosómicas presentes en la placa.

2. Analizador de masas: utiliza un campo eléctrico o magnético para acelerar los iones y separarlos en función de su relación masa/carga (m/z). A través de una colisión aleatoria en la fase gaseosa, la carga se transfiere desde la matriz a las moléculas microbianas. Los iones de estas moléculas se aceleran en base a la relación masa-carga en el analizador de masas TOF, un tubo al vacío. De esta forma, tras la migración en un campo electromagnético, los iones se separan en función de su peso molecular. El grado de ionización, así como la masa de las proteínas, determinan lo que conoce como "tiempo de vuelo individual" (Singhal, N. et al., 2015).

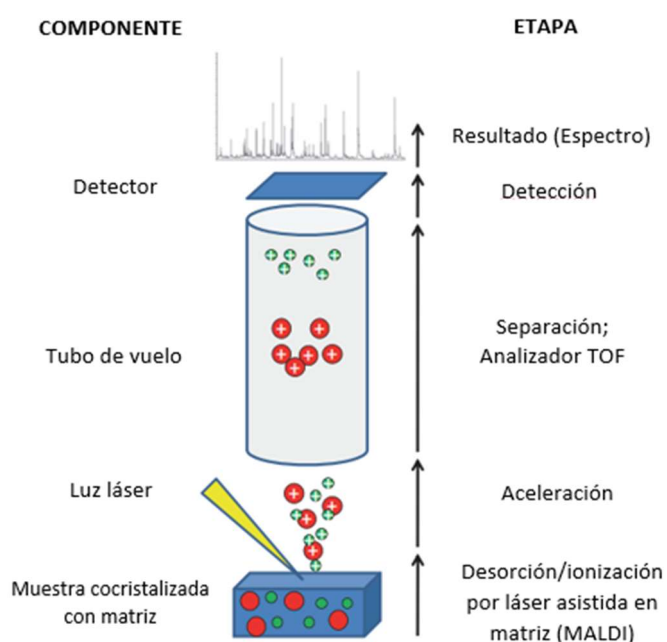


Figura 1: Esquema de un espectrómetro de masas. Tomado de Croxatto et al, 2012

3. **Detector:** los iones que llegan al detector producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador. El registro obtenido es el espectro de masas o también denominado huella química (Bou, G. et al., 2011).

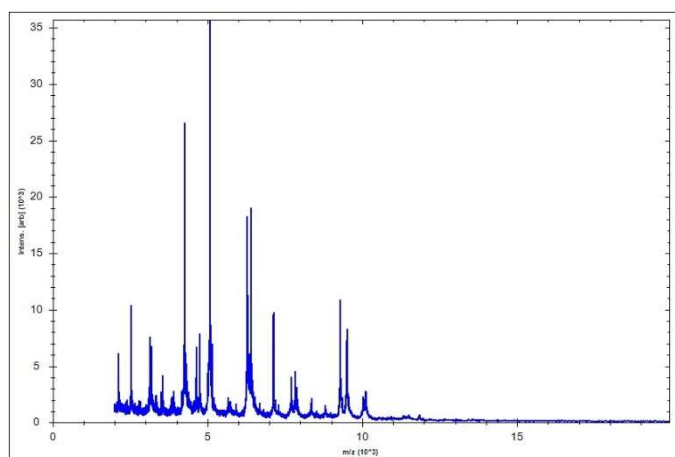


Figura 2: Ejemplo de espectro bacteriano.

Esta huella química es la expresión de las principales proteínas ribosómicas, presentes en los microorganismos con independencia de las condiciones de crecimiento bacteriano y además, son las células proteínicas más abundantes (Ryzhov, V. et al., 2001). Es decir, el procedimiento proporciona un espectro proteico único para cada microorganismo. La huella de péptidos obtenida es única para cada microorganismo y es comparada con la huella de los microorganismos conocidos presentes en la base de datos; de tal forma que la huella problema se puede asociar estadísticamente con la huella más semejante y realizar así la identificación del microorganismo. Estos sistemas además informan al usuario del grado de confianza de los resultados de la identificación para cada muestra (Bou, G. et al., 2011).

Al tratarse de una prueba muy sensible, se requiere una pequeña cantidad de bacterias para llevar a cabo el análisis. Existen diferentes métodos de preparación de la muestra (Patel, R., 2015):

- ✓ Método I: transferencia directa usando una colonia bacteriana.
- ✓ Método II: transferencia directa extendida.
- ✓ Método III: extracción para la obtención de una base de datos de referencia.

El objetivo final de las técnicas de espectrometría de masas aplicadas a la caracterización bacteriana es la identificación a nivel de género y especie del microorganismo. MALDI-TOF MS es más rápido y preciso que otros métodos convencionales, pero aunque entre sus ventajas destaca la significativa reducción del tiempo necesario en la identificación, en contrapartida se encuentra la elevada inversión inicial que supone la adquisición de los equipos, aunque esta es amortizada por los bajos costes de laboratorio, debido a la escasa cantidad de material necesario.

A modo de ejemplo, si el tiempo empleado en una identificación convencional varía entre 24-72 horas, con la automatización de los laboratorios de microbiología se ha logrado reducir este tiempo a 8-10 horas (Hervé, E.B, 2015). Actualmente varios hospitales incluyen ya esta tecnología para sus diagnósticos, lo que ha supuesto un impacto muy positivo en la atención al paciente (Huang, A.M et al., 2013). Las aplicaciones de MALDI-TOF MS pueden ser muy variadas, existiendo en la bibliografía estudios sobre: detección de

agentes de guerra biológica, detección de patógenos en agua y alimentos, resistencia a antibióticos, estudios epidemiológicos, infecciones de sangre o del tracto urinario, además del gran avance en la identificación de microorganismos (Singhal, N. et al., 2015).

2. Material y Métodos

Para la realización de este trabajo hemos utilizado el espectrómetro de masas de altas prestaciones, con analizador por tiempo de vuelo (TOF, Time of Flight) y fuente de ionización MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization), de la Universidad de Córdoba, ubicado en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI). Actualmente, este servicio depende de la Unidad de Proteómica integrada en el Área de Biología Molecular, en el Edificio Ramón y Cajal del Campus Universitario de Rabanales.

2.1 Identificación de especies bacterianas

2.1.1 Material patológico

En total hemos analizado de 40 aislados pertenecientes a diferentes especies bacterianas, previamente caracterizadas mediante pruebas convencionales (todas las cepas) y moleculares (sólo en el caso de *P. multocida*) en el laboratorio de diagnóstico de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Córdoba.

Esta primera identificación se ha llevado a cabo con aislamientos pertenecientes a diez géneros diferentes, (incluyendo bacterias gram-negativas y gram-positivas). Concretamente se han analizado las especies: *St. aureus* (n=5),

P. multocida (n=21), *Escherichia coli* (n=3), *Rodococcus equi* (n=1), *Yersinia enterocolitica* (n=1), *Pseudomonas aeruginosa* (n=1), *Trueperella pyogenes* (n=1), *Streptococcus suis* (n=1), *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* (n=1), *Corynebacterium pseudotuberculosis* (n=1), *Erysipelothrix rhusiopathiae* (n=2) y *Salmonella* spp. (n=2).

El mayor número de aislados de *P. multocida* con relación al resto de especies responde al objetivo de profundizar en el análisis de estos aislados.

En todos los casos, las cepas estaban conservadas a una temperatura de menos 80°C mediante el sistema Maintenance Freeze Medium (Oxoid, TP15731) en viales de 1mL. A partir de estos viales, se recuperaron utilizando agar sangre, combinación de un agar base (Oxoid CM55) suplementado con un 5% de sangre de ovino desfibrinada y estéril. Una vez sembradas, las cepas se incubaron a 35°C entre 24-48 horas en condiciones de microaerofilia.

2.1.2 Preparación de la muestra a partir de una colonia

A pesar de que la identificación de la mayoría de las bacterias no suele suponer un problema siguiendo los protocolos que facilitan los fabricantes, hay ciertos aspectos en la preparación de la muestra que pueden interferir en la fiabilidad de esta. Diversos estudios han evaluado diferentes variables en la preparación de las colonias bacterianas (la densidad de la extensión del microorganismo, el uso de ácido fórmico previo a la dispensación de la matriz, la temperatura de incubación del cultivo o el tipo de medio de cultivo utilizado), llegando a la conclusión de que tanto la temperatura como el medio de cultivo

empleado no afectan a la calidad de la identificación (Jordana-Lluch, E. et al., 2012).

Por este motivo, el primer objetivo planteado en nuestro estudio fue determinar el método óptimo de preparación de la muestra para la identificación de aislados incluidos en nuestro estudio.

En cuanto a la muestra de partida, en la bibliografía se describen dos aproximaciones diferentes:

1) Análisis de células intactas: esta puede realizarse mediante transferencia directa o mediante transferencia directa extendida.

2) Extracción de proteínas: la extracción de proteínas a su vez puede realizarse mediante etanol y ácido fórmico o mediante ácido trifluoroacético (TFA).

En nuestro trabajo hemos llevado a cabo los siguientes métodos de extracción:

✓ Método I: Análisis de células intactas mediante transferencia directa

Mediante este método se analizaron 20 cepas de las descritas en el material patológico que incluyen a todas las especies, pero solo 1 aislado de *P. multocida*.

Para llevarlo a cabo tomamos una pequeña cantidad de microorganismo (una colonia), que depositamos directamente sobre un pocillo de la placa metálica del MALDI y cubrimos con 1 µl de la matriz orgánica*. Finalmente dejamos la muestra a temperatura ambiente durante unos minutos hasta su completo secado.

**Preparación de la matriz orgánica HCCA.*

Se añaden 250 µL de disolvente estándar (50 % de acetonitrilo, 47,5 % de agua y 2,5 % de TFA) a un tubo con tapa roscada que contiene HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico) y se cierra bien el tubo (concentración final: 10 mg IVD HCCA/mL).

Los espectros para cada aislado fueron obtenidos con 240 disparos del láser en seis regiones distintas, efectuados en el mismo pocillo. Los espectros fueron analizados con el software MALDI Biotyper® RTC 3.0 (Bruker Daltonics, Alemania).

✓ Método II: Análisis de células intactas mediante transferencia directa extendida

Este método se diferencia del anterior en que incluye una extracción parcial usando el ácido fórmico. Para llevarlo a cabo se utilizaron las mismas cepas descritas en el método I.

Así, tomamos de nuevo una pequeña cantidad de microorganismo, que depositamos directamente sobre un pocillo de la placa metálica del MALDI. Cubrimos el material con 1µl de ácido fórmico al 70% y dejamos secar a temperatura ambiente. Una vez seco, se vuelve a cubrir con 1µl de matriz HCCA y se deja secar durante una hora a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, la placa metálica estará lista para la lectura con el MALDI-TOF.

✓ Método III: Extracción de proteínas mediante etanol y ácido fórmico

La bibliografía describe que una extracción previa de proteínas mejora la identificación, sobre todo cuando se trata de bacterias gram positivas y levaduras (Patel, R., 2015). Este método es más laborioso que los anteriores y sería más complicado llevarlo a cabo en el diagnóstico rutinario si bien, cuando se pretende estudiar en profundidad el proteoma de los aislamientos, este es el método recomendado, pues identifica mejor las proteínas dando lugar a espectros más claros. Por este motivo, los aislados que estudiamos mediante este método fueron exclusivamente 20 cepas de *P. multocida*.

Las cepas de *P. multocida* deben estar en fresco para comenzar la extracción; la bacteria se somete a un tratamiento con etanol, ácido fórmico y acetonitrilo. Este método tiene la ventaja de poder conservar las muestras congeladas en agua:etanol (1:3) durante varias semanas antes de terminar la extracción y posterior colocación en la placa del MALDI. Los pasos necesarios para realizar la extracción son los siguientes:

1. Pipetear 300 µL de agua de calidad HPLC (Panreac) en un tubo de Eppendorf de 1.5 mL.
2. Extraer con un asa una cantidad entre 5-10 mg de *P. multocida* que se trasladan al tubo de Eppendorf.
3. Agitar intensamente en vórtex, agregar 900 µl de etanol al 97% y agitar nuevamente en vórtex.
4. Centrifugar a 14 000 r.p.m. durante 2 minutos y eliminar el sobrenadante utilizando una pipeta, volver a centrifugar y retirar cuidadosamente los residuos de etanol sin tocar el sedimento.
5. Dejar el sedimento secar a temperatura ambiente durante 2 a 3 minutos.
6. Añadir ácido fórmico al 70% (1-5 µL) al sedimento y mezclar bien con la pipeta o usando un vórtex.

7. Según la cantidad de sedimento, incorporar de 1-5 μL de acetonitrilo (Fluka analytical Sigma-Aldrich). Usar la misma cantidad de ácido fórmico y de acetonitrilo.
8. Centrifugar durante 2 minutos a máxima velocidad 14 000 r.p.m., así todo el material queda mezclado en el sedimento.
9. Pipetear 1 μL del sobrenadante en la placa metálica MALDI y dejar secar a temperatura ambiente.
10. Cubrir todo el pocillo de la placa metálica con 1 μL de solución matriz HCCA (Bruker Daltonics) y secar durante unos 30 minutos a temperatura ambiente antes de proceder a la lectura.

La adquisición de espectros se realiza mediante un espectrómetro de masas Microflex L20 (Bruker Daltonics) equipado con un láser N2, en modo ion lineal positivo. El voltaje de aceleración es 20 kV. Los espectros son adquiridos como la suma de 240 disparos por diana. El rango de masa utilizado para el análisis es de 2.000-20 000 Da. El programa utilizado para el procesamiento de datos es el BioTyper 3.0 (Bruker Daltonics).

2.1.3 Interpretación de los resultados

Los registros que se generan se recogen en un software informático (MALDI Biotyper RTC 3.0) que compara automáticamente los espectros recogidos con un banco de datos de referencia que contiene una amplia variedad de aislamientos relevantes, generando un valor numérico (score) en base a las similitudes entre los conjuntos de datos observados y almacenados. Después del análisis, el software proporciona no solo el resultado de identificación, sino también el grado de fiabilidad de dicha identificación:

Un valor de score superior a 2.0 se considera generalmente como una identificación a nivel de género y especie válida; los valores entre 2.0 y 1.7

representan identificaciones a nivel de género fiables, en cambio los valores menores de 1.7 representan una identificación poco fiable. No cabe duda de que el requisito más importante para la identificación exacta de los microorganismos es la existencia de datos de referencia fiables en la base de datos (Hsieh et al., 2008).

En nuestro estudio hemos generado varios valores de score en función del método de preparación de la muestra:

- ✓ Método I: Análisis de células intactas mediante transferencia directa
Generó el score 1a y 1b.
- ✓ Método II: Análisis de células intactas mediante transferencia directa extendida
Generó el score 2.
- ✓ Método III: Extracción de proteínas mediante etanol y ácido fórmico
Generó el score 3a y 3b.

Además del valor de score, el software crea una huella química específica de cada microorganismo que fue analizada en cada caso.

Finalmente, a partir de los resultados el software permite obtener una imagen gráfica en forma de dendograma donde puede observarse la diversidad existente entre las cepas analizadas en base a los espectros generados. En nuestro estudio, sólo generamos el dendograma a partir de los resultados obtenidos con los aislados de *P. multocida*.

2.1.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa *IBM SPSS Statistics 22*.

Para determinar si las diferencias en los valores de score obtenidos mediante el método 1 (score 1a y score 1b) y el método 2 (score 2) eran estadísticamente significativos, realizamos un análisis utilizando la *prueba de Wilcoxon* para muestras relacionadas y su p asociada.

Valores de $p \leq 0,05$ indican la existencia de diferencias significativas entre ambos valores.

2.2 Detección de factores de virulencia

Otro campo interesante para la aplicación de MALDI-TOF es la detección de factores de virulencia, que puede ser de gran utilidad para la mejor y más rápida caracterización de microorganismos causantes de infecciones. El conocimiento de los factores de virulencia presentes en cepas aisladas de muestras clínicas podría ayudar al correcto manejo de pacientes o brotes, estratificarlos según el riesgo de desarrollar ciertas complicaciones o incluso, identificar aquellos que pueden beneficiarse de un determinado tratamiento.

De nuevo, para la realización de este estudio se analizaron los resultados obtenidos a partir de las 20 cepas de *P. multocida*. Estas cepas fueron identificadas en trabajos previos a nivel de especie, biotipo, tipo capsular y factores de virulencia por nuestro grupo de investigación. Todos los aislados

pertenecían al tipo capsular B y biovar 3. Las características de estas cepas se muestran en la tabla 1.

Table 1: Genotipo asociado a la virulencia de las cepas de *P. multocida* analizadas

Ref	OmpH	PsI	ptfA	tbPA	nanH	pfhA	HgbB	HgbA	sodC	SodA	exBD-tonB	oma87	nanB
2	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
4	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+
9	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+
10	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+
11	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
13	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
21	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	D	+	-
23	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
26	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
28	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
A17	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	D	D	+
A14	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+
A15	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
A7	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
A11	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+
A8	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+
A6	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+
A4	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
A10	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
A13	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+

2.2.1 Interpretación de resultados

El espectro de cada una de las cepas fue analizado usando el software informático *MALDI Biotyper RTC 3.0*.

En este apartado hemos llevado a cabo la comparación entre los espectros de 20 cepas en estudio, obteniéndose un valor score, que en este caso indica el grado de similitud entre cepas diferentes.

En este caso se llevaron a cabo comparaciones entre los espectros de las 20 cepas en estudio; obteniéndose valores de score, que en este caso indica el grado de similitud entre cepas diferentes.

3. Resultados y Discusión

Siguiendo el mismo esquema empleado en el apartado de material y métodos, a continuación, mostraremos los resultados obtenidos tras la identificación de los microorganismos en estudio mediante el sistema MALDI-TOF.

3.1 Identificación de especies bacterianas

Para llevar a cabo la identificación de las bacterias, empleamos tres métodos diferentes de preparación de la muestra. En primer lugar, expondremos los resultados obtenidos a partir del método I.

✓ Método I: Análisis de células intactas mediante transferencia directa

El análisis mediante este método se repitió dos veces obteniendo dos medidas (score 1a y score 1b), tal y como se muestra en la tabla 2.

En verde aparecen los valores superiores a 2 que indican que la identificación a nivel de género y especies es fiable. Es decir, que la comparación entre los espectros obtenidos de cada microorganismo y los espectros de la base de datos del software, proporcionan un score que puede concluir la identificación de este. Tanto la primera medida (score 1a) como la segunda (score 1b) identificaron 11/20 cepas con valores superiores a dos, aunque ambas medidas no coincidieran en las mismas especies.

Tabla 2. Identificación de microorganismos por el método I.

REF. CEPA	ID MUESTRA	IDENTIFICACIÓN MÉTODO I	SCORE 1a	IDENTIFICACIÓN MÉTODO I	SCORE 1b
101	<i>St. aureus</i> ATCC 29213	<i>St. aureus</i>	1,77	No Identificado	1,67
102	<i>St. aureus</i>	<i>St. aureus</i>	1,83	<i>St. aureus</i>	2,09
103	<i>St. aureus</i>	<i>St. aureus</i>	1,84	<i>E. coli</i>	2,21
104	<i>St. aureus</i> CETC 240 ATCC	<i>St. aureus</i>	2,21	<i>St. aureus</i>	1,95
105	<i>St. aureus</i>	<i>St. aureus</i>	2,17	<i>St. aureus</i>	2,06
106	<i>R. equi</i> ATCC 6939	No Identificado	1,63	No Identificado	1,46
107	<i>P. multocida</i> CETC 902	<i>P. multocida</i>	2,38	<i>P. multocida</i>	2,41
108	<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC	<i>Y. enterocolitica</i>	2,27	<i>Y. enterocolitica</i>	2,2
109	<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC	<i>Arthrobacter</i>	2,08	<i>Arthrobacter</i>	2,06
110	<i>T. pyogenes</i> ATCC	<i>Staphylococcus</i>	1,83	<i>Staphylococcus</i>	1,86
111	<i>S. suis</i>	No Identificado	1,46	No Identificado	1,6
112	<i>S. equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i>	<i>S. equi</i> ssp	1,79	<i>S. equi</i> ssp	2,02
113	<i>C. pseudotuberculosis</i> 29351	No Identificado	1,4	No Identificado	1,63
114	<i>E. coli</i> ATCC 25992	<i>E. coli</i>	2	<i>E. coli</i>	2,25
115	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	2,26	<i>E. coli</i>	2,28
116	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	2,19	No Identificado	1,38
117	<i>E. rhusiopathiae</i>	<i>E. rhusiopathiae</i>	1,77	<i>E. rhusiopathiae</i>	1,85
118	<i>E. rhusiopathiae</i>	<i>E. rhusiopathiae</i>	2,17	<i>E. rhusiopathiae</i>	2,24
119	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella</i> sp	2,41	<i>Salmonella</i> spp.	2,49
120	<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella</i> sp	2,1	No Identificado	1,61

En naranja se representan los valores de score entre 1,7 y 2, interpretándose esto como un resultado de identificación confiable a nivel de género, pero no a nivel de especie. La primera medida (score 1a) identificó con este nivel de confianza 6/20 cepas, mientras que la segunda (score 1b) solamente lo hizo en 3/20. Ambas mediciones solamente coincidieron en el caso de dos cepas: *Trueperella pyogenes* (Ref. 110) indentificada como *Staphylococcus* y otra de *E. rhusiopathiae* (Ref. 117).

Por último, en rojo aparecen aquellos aislados con valores de score menor de 1,7 y por tanto estos microorganismos o no pueden ser identificados, o la base de datos identifica un resultado no relevante.

La primera medida (score 1a) no fue capaz de identificar 3/20 aislamientos, mientras que en la segunda medida (score 1b) este número se duplicó (6/20). En total, este método de extracción no fue capaz de identificar a tres microorganismos

concretamente: *Rhodococcus equi* (Ref 106), *Streptococcus suis* (Ref 111) y *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Ref 113), todas ellas bacterias gram positivas.

Para comprobar si las diferencias entre los valores de score 1a y score 1b eran significativas, practicamos el test de Wilcoxon a los datos, obteniendo un valor de $p = 0.556$, lo que se interpreta como la ausencia de diferencias significativas entre las dos mediciones realizadas.

Según la bibliografía, el análisis de células intactas es usado en el 90-95% de las muestras rutinarias, por tratarse de un protocolo fácil, rápido y más económico (Bou et al., 2011). No obstante, nuestros resultados muestran la conveniencia de realizar varias mediciones sobre una misma muestra para poder seleccionar el mejor valor de score en cada caso.

Para tratar de mejorar estos datos de identificación, en nuestro trabajo hemos introducido una pequeña variación al análisis de células intactas, realizando a las cepas un tratamiento con ácido fórmico (método II).

- ✓ Método II: Análisis de las células intactas mediante transferencia directa extendida

Del mismo modo que en el apartado anterior, los resultados se muestran mediante los valores de score (score 2) que aparecen en la tabla 3.

Table 3. Identificación de microorganismos por el método II.

REF. CEPA	ID MUESTRA	SCORE 2	METODO II
101	<i>St. aureus</i> ATCC 29213	2,41	<i>St. aureus</i>
102	<i>St. aureus</i>	2,26	<i>St. aureus</i>
103	<i>St. aureus</i>	2,44	<i>St. aureus</i>
104	<i>St. aureus</i> CETC 240 ATCC 63280	2,41	<i>St. aureus</i>
105	<i>St. aureus</i>	2,39	<i>St. aureus</i>
106	<i>R. equi</i> ATCC 6939	2,33	<i>R. equi</i>
107	<i>P. multocida</i> CETC 902	2,40	<i>P. multocida</i>
108	<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 4610	2,36	<i>Y. enterocolitica</i>
109	<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC	2,20	<i>Arthrobacter polychromogenes</i>
110	<i>A. pyogenes</i> ATCC	2,44	<i>St. aureus</i>
111	<i>S. suis</i>	2,52	<i>S. suis</i>
112	<i>S. equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i> 423/06	2,51	<i>S. equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i>
113	<i>C. pseudotuberculosis</i> 29351	2,41	<i>C. pseudotuberculosis</i>
114	<i>E. coli</i> ATCC 25992	2,18	<i>E. coli</i>
115	<i>E. coli</i>	2,27	<i>E. coli</i>
116	<i>E. coli</i>	2,25	<i>E. coli</i>
117	<i>E. rhusiopathiae</i>	2,45	<i>E. rhusiopathiae</i>
118	<i>E. rhusiopathiae</i>	2,46	<i>E. rhusiopathiae</i>
119	<i>Salmonella</i> spp.	2,38	<i>Salmonella</i> spp.
120	<i>S. Typhimurium</i>	2,54	<i>Salmonella</i> spp.

Como puede observarse todos nuestros resultados son fiables a nivel de género y especie por lo que la adicción de ácido fórmico a la placa mejoró la calidad del espectro generado en todos los casos.

No obstante, la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* fue identificada como *Arthrobacter*. En el caso de encontrar identificaciones discordantes la bibliografía recomienda la secuenciación del gen 16S para confirmar la identificación, confirmándose el resultado de MALDI-TOF en el 75% de los casos (Jordana-Lluch et al., 2012).

Una vez obtenidos estos valores, comprobamos la significación estadística entre el score 1a y el score 2 así como entre el score 1b y el score 2, mediante el test de Wilcoxon. En todos los casos el valor de p asociado fue menor de 0,05, indicando que el método de preparación de la muestra mediante la transferencia

directa extendida mejoró significativamente el resultado de identificación respecto al obtenido con el método de transferencia directa (método I).

La adición de ácido fórmico a la placa MALDI previa a la lectura ha sido descrita por otros autores que muestran como este método puede ser beneficioso en la identificación de ciertos tipos de organismos como los hongos o bacterias de pared gruesa (Zboromyska, 2015). En nuestro estudio, comprobamos como todos los valores de score fueron mejorados empleando esta técnica.

A continuación, mostraremos los resultados obtenidos tras el tratamiento previo de la muestra con el método III.

✓ Método III: extracción de proteínas mediante etanol-ácido fórmico.

Como se indica en el apartado de material y métodos, según la bibliografía consultada, esta técnica mejora el resultado de la identificación sobre todo en el caso de bacterias gram positivas y levaduras (Jordana-Lluch et al., 2012). Además la extracción de proteínas con este tratamiento se traduce en representaciones de la huella química o espectro de los aislados más nítidos, permitiendo el estudio de forma más específica del proteoma de las bacterias. Este método requiere una mayor inversión de tiempo y recursos económicos comparados con las anteriores.

Por este motivo, mediante el método III solamente estudiamos los aislados de *P. multocida* previamente identificados a nivel de fenotipo y genotipo por nuestro grupo de investigación. Los valores de score obtenidos tras realizar dos mediciones utilizando el mismo método (score 3a y score 3b) se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Cepas de *P. multocida* analizadas con el método III.

REF. CEPA	Score 3a	Score 3b	Identificación MALDI-TOF
cepa 2	2,25	2,24	<i>P. multocida</i>
cepa 4	2,4	2,38	<i>P. multocida</i>
cepa 9	2,42	2,41	<i>P. multocida</i>
cepa 10	2,46	2,41	<i>P. multocida</i>
cepa 11	2,26	2,24	<i>P. multocida</i>
cepa 13	2,36	2,35	<i>P. multocida</i>
cepa 21	2,43	2,41	<i>P. multocida</i>
cepa 23	2,39	2,33	<i>P. multocida</i>
cepa 26	2,41	2,36	<i>P. multocida</i>
cepa 28	2,42	2,42	<i>P. multocida</i>
285/13	2,44	2,48	<i>P. multocida</i>
38/11	2,19	2,23	<i>P. multocida</i>
286/12	2,17	2,21	<i>P. multocida</i>
287/12	2,45	2,49	<i>P. multocida</i>
03/14	2,39	2,43	<i>P. multocida</i>
205/13	2,45	2,49	<i>P. multocida</i>
291/11	2,28	2,32	<i>P. multocida</i>
150/13	2,42	2,46	<i>P. multocida</i>
101/15	2,41	2,45	<i>P. multocida</i>
197/13	2,36	2,4	<i>P. multocida</i>

Como puede comprobarse y como era de esperar, todas los aislados presentaron valores de score por encima de 2, sin que apareciera ninguna discordancia entre las medidas realizadas. Como se indicó anteriormente la huella química generada mediante este método permite una mejor diferenciación de las proteínas que integran el proteoma de las bacterias.

A continuación en la siguiente figura se muestra la huella obtenida de la cepa 107 mediante el método de preparación II (figura 3a) y el método de preparación III (figura 3b).

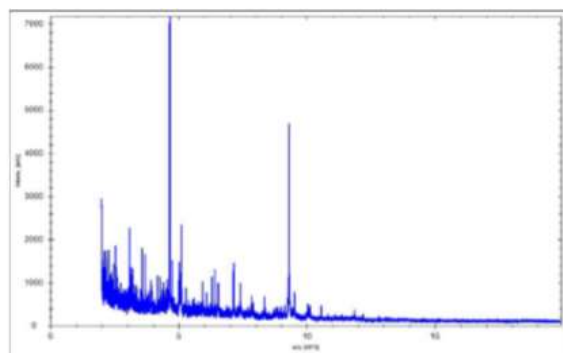


Figura 3a. Espectro cepa 107 por el método II.

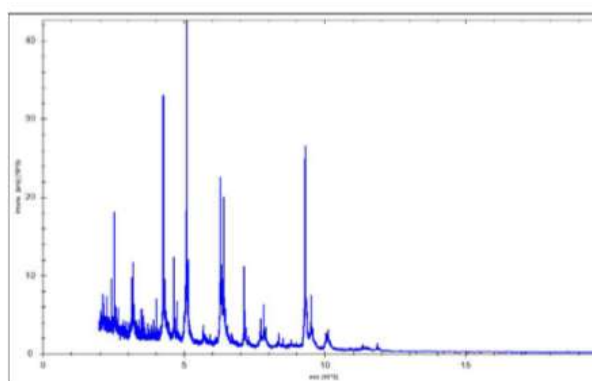


Figure 3b. Espectro cepa 2 (107) por el método III

3.2 Detección de factores de virulencia

A partir del análisis proteico realizado con el software MALDI-TOF biotyper 3.0 obtuvimos una representación gráfica en forma de dendograma, que muestra el grado de similitud entre los proteomas de las cepas analizadas (Figura 4).

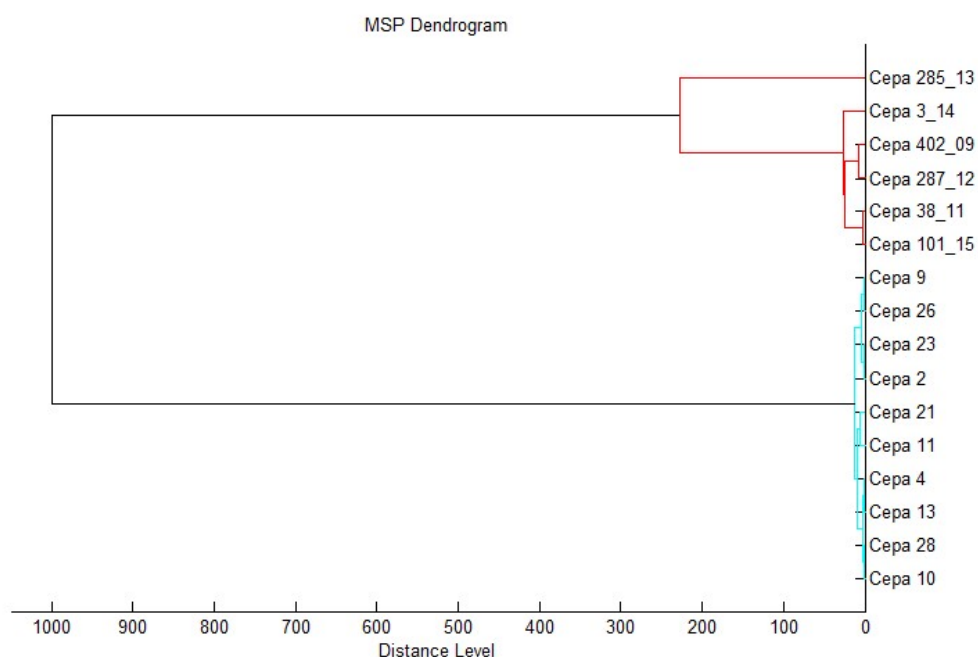


Figura 4. Representación del grado de similitud de los espectros de 16 cepas por la base de datos MALDI-TOF biotyper 3.0

Como puede observarse, el análisis muestra dos clusters bien diferenciados en base al proteoma, uno que incluye seis cepas (CLUSTER A) y otro con diez cepas (CLUSTER B). Ambos clusters presentan un nivel de distancia muy elevado entre ellos. Teniendo en cuenta que los 16 aislamientos pertenecen a la misma especie bacteriana, igual biotipo y similar grupo capsular, estas diferencias tan manifiestas no son fácilmente explicables. En nuestro estudio no llevamos a cabo la identificación de los aislados a nivel de subespecie pero la hipótesis de que pudiera tratarse de diferentes subespecies no es muy probable, pues como ya indicaron Kuhnert et al, en 2012, la resolución de MALDI-TOF no es lo suficientemente alta como para discriminar las tres subespecies de *P. multocida*.

También es posible que puedan encontrarse variaciones en el proteoma de los microorganismos en función de las condiciones de cultivo (por ejemplo en aquellos cultivados bajo condiciones de restricción de hierro), aunque en nuestro trabajo todos los aislados fueron cultivados en similares condiciones.

Hasta ahora, los antígenos responsables del desarrollo de la septicemia hemorrágica en animales no están claramente definidos, por lo que el conocimiento del proteoma de *P. multocida* ayudará sin duda a identificar los posibles factores de virulencia, los antígenos útiles para su diagnóstico, las dianas de los medicamentos y los candidatos a vacunas. En este sentido, los estudios proteómicos mediante el uso de espectrómetros de masas (LC MS/MS, MALDI-TOF-MS) combinados con herramientas bioinformáticas (algoritmos/software de predicción de proteínas) resultan prometedores.

Este trabajo se presenta como una iniciación al estudio de los microorganismos mediante esta tecnología y nos ha permitido poner a punto, con el apoyo inestimable del personal del SCAI, el equipo MALDI-TOF recientemente adquirido por la Universidad de Córdoba. Serán necesarios varios estudios para llegar a un grado óptimo en la explotación de las posibilidades que la espectrometría de masas ofrece al campo de la microbiología.

Referencias

- Anhalt, J. P., & Fenselau, C. (1975). IDENTIFICATION OF BACTERIA USING MASS-SPECTROMETRY. *Analytical Chemistry*, 47(2), 219-225.
- Blackall, P. J., Pahoff, J. L., & Bowles, R. (1997). Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian pigs. *Veterinary Microbiology*, 57(4), 355-360.
- Bosch, M., Garrido, M. E., Llagostera, M., de Rozas, A. M. P., Badiola, I., & Barbe, J. (2002). Characterization of the *Pasteurella multocida* hgbA gene encoding a hemoglobin-binding protein. *Infection and Immunity*, 70(11), 5955-5964.
- Bou, G., Fernandez-Olmos, A., Garcia, C., Saez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Bacterial identification methods in the microbiology laboratory. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608.
- Cardoso-Toset F, Gómez-Laguna J, Callejo M, Vela AI, Carrasco L, Fernández-Garayzábal JF, Maldonado A, Luque I; (2013). Septicaemic pasteurellosis in free-range pigs associated with an unusual biovar 13 of *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology* 6314; No. of Pages 5
- Christensen, J. P. y Bisgaard, M. (2000). Fowl cholera. *Rev.Sci.Tech.* 19, 626-637.
- Croxatto A., Guy Prod'hom, Gilbert Greub. (2012) Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 36 (2):380-407.

Cuevas, I.; Pachecho, I.; Marín, J.C.; Carbonero, A.; Cano, D.; García Bocanegra, I.; Borge, C.XII Congreso Internacional Anembe de Medicina Bovina Santiago de Compostela

De Alwis M.C.L (1999). Haemorrhagic Septicaemia. Australian Centre for International Agricultural Research Monograph No.57

Doern, C. D., & Butler-Wu, S. M. (2016). Emerging and Future Applications of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry in the Clinical Microbiology Laboratory A Report of the Association for Molecular Pathology. *Journal of Molecular Diagnostics*, 18(6), 789-802.

Doughty, S. W., Ruffolo, C. G., & Adler, B. (2000). The type 4 fimbrial subunit gene of *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology*, 72(1-2), 79-90.

Ewers, C., Lubke-Becker, A., Wieler, L.H., (2004). *Pasteurella*: insights into the virulence determinants of a heterogenous bacterium. *Berl. Munch. Tierarztl.Wochenschr.* 9–10, 367–386.

Ferreira, L., Sanchez-Juanes, F., Gonzalez-Avila, M., Cembrero-Fucinos, D., Herrero-Hernandez, A., Gonzalez-Buitrago, J. M., et al. (2010). Direct Identification of Urinary Tract Pathogens from Urine Samples by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(6), 2110-2115.

Frey, J., & Kuhnert, P. (2015). Identification of Animal Pasteurellaceae by MALDI-TOF Mass Spectrometry. In M. V. Cunha & J. Inacio (Eds.), *Veterinary Infection Biology: Molecular Diagnostics and High-Throughput Strategies*, Vol. 1247, pp. 235-243.

- Totowa: Humana Press Inc. Gamage, I. N. A., Wijewardana, T. G., Bastianzs, H. L. G., y Vipulasiri, A. A. (1995). An outbreak of acute pasteurellosis in swine caused by serotype B:2 in Sri Lanka. *Sri Lanka Veterinary Journal* 42, 15-19.
- Hancock, R. E., Siehnel, R., y Martin, N. (1990). Outer membrane proteins of *Pseudomonas*. *Mol.Microbiol.* 4, 1069-1075.
- Harper, M., Boyce, J. D., & Adler, B. (2006). *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *Fems Microbiology Letters*, 265(1), 1-10.
- Hervé. E. Beatrice (2015). New technologies in microbiology: Automatization and some applications in microbial identification and susceptibility test. *Revision Medica Clinica Condes*, 26(6), 753-763.
- Horneffer, V., Forsmann, A., Strupat, K., Hillenkamp, F., & Kubitscheck, U. (2001). Localization of analyte molecules in MALDI preparations by confocal laser scanning microscopy. *Analytical Chemistry*, 73(5), 1016-1022.
- Hsieh, S. Y., Tseng, C. L., Lee, Y. S., Kuo, A. J., Sun, C. F., Lin, Y. H., et al. (2008). Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS. *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(2), 448-456.
- Huang, A. M., Newton, D., Kunapuli, A., Gandhi, T. N., Washer, L. L., Isip, J., et al. (2013). Impact of Rapid Organism Identification via Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Combined With Antimicrobial Stewardship Team Intervention in Adult Patients With Bacteremia and Candidemia. *Clinical Infectious Diseases*, 57(9), 1237-1245.
- Iaria, C. y Cascio, A. (2007). Please, do not forget *Pasteurella multocida*. *Clin.Infect.Dis.* 45, 940.

- Koneman, E. W., Stephen, D. A., Williams, M. J., y Schrenberger, P. G. (1999). Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana. 388-461.
- Legarraga, P., Moraga, M., Lam, M., Geoffroy, E., Zumaran, C., & Garcia, P. (2013). Impact of mass spectrometry by MALDI-TOF MS for the rapid identification of aerobic and anaerobic bacteria of clinical importance. *Revista Chilena De Infectologia*, 30(2), 140-146.
- Mellmann, A., Cloud, J., Maier, T., Keckevoet, U., Ramming, I., Iwen, P., et al. (2008). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(6), 1946-1954.
- Olsen, I., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., y Busse, H. J. (2005). Family I. Pasteurellaceae Pohl 1981b, 382 VP. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. D.J.Brenner, N.R.Krieg, J.T.Staley and G.M.Garrity (eds.). 2, 851-856.
- O'Neill, E., Moloney, A., y Hickey, M. (2005). *Pasteurella multocida* meningitis: case report and review of the literature. *J.Infect.* 50, 344-345.
- Patel, R. (2016). The MALDI-TOF mass spectrometry for the diagnosis of infectious diseases. *Biochimica Clinica*, 40(2), 154-165.
- Pijoan, C. (2006). Pneumonic Pasteurellosis. In *Diseases of Swine*, 9 th edition. B.Straw, J.J.Zimmerman, S.Dallaire, y D.J.Taylor. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA.719-726.
- Rychert, J., Slechta, E. S., Barker, A. P., Miranda, E., Babady, N. E., Tang, Y. W., et al. (2018). Multicenter Evaluation of the Vitek MS v3.0 System for the Identification of Filamentous Fungi. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(2), 11.

- Ryzhov, V., & Fenselau, C. (2001). Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. *Analytical Chemistry*, 73(4), 746-750.
- Sanchez, S., Mizan, S., Quist, C., Schroder, P., Juneau, M., Dawe, D., et al. (2004). Serological response to *Pasteurella multocida* NanH sialidase in persistently colonized rabbits. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(5), 825-834.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6, 16.
- Townsend, K. M., O'Boyle, D., Phan, T. T., Hanh, T. X., Wijewardana, T. G., Wilkie, I., Trung, N. T., y Frost, A. J. (1998b). Acute septicaemic pasteurellosis in Vietnamese pigs. *Vet. Microbiol.* 63, 205-215.
- Wilson, B. A., & Ho, M. F. (2013). *Pasteurella multocida*: from Zoonosis to Cellular Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), 631-655.
- Zboromyrska, Y. (2015). Aplicaciones del MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología. *Educación Continuada en el Laboratorio Clínico* , 20:87-98.

Estudio 5

Objetivo 5

**Estudio 5: “Antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* type B isolates associated with acute septicemia in pigs and cattle in Spain”.
Cuevas et al., 2020. Trabajo aceptado en BCM Veterinary Research.**

Objetivo 5: Estudio de la sensibilidad antimicrobiana de los aislados de *P. multocida* tipo B procedentes de ganado porcino y bovino en España.

***Antimicrobial resistance of Pasteurella multocida type B isolates
associated with acute septicemia in pigs and cattle in Spain”***

Inmaculada Cuevas^a, Alfonso Carbonero^a, David Cano^a, Ignacio García-
Bocanegra^a, Carmen Borge^a

^a*Animal Health Department (AGR149), University of Cordoba. Campus of
Rabanales, 14071, Cordoba, Spain ‘International Excellence Agrifood Campus,
CeIA3’.*

*Corresponding author: Carmen Borge Rodríguez.

E-mail address: carmen.borge@uco.es

Short title: *Antimicrobial resistance of Pasteurella multocida type B*

Abstract

Background: *Pasteurella multocida* is the etiological agent responsible for several diseases in a wide range of hosts around the world and thus, causes serious economic losses. Acute septicemia associated with capsular type B *P. multocida* has recently emerged in Europe and continuous outbreaks of these acute processes have been described in Spain since they were first detected in pigs in 2009 and cattle in 2015. The scarcity of studies on the antimicrobial susceptibility of this capsular type of *P. multocida* and growing concern about the general increase of antimicrobial resistance mean that studies related to the performance of type B *P. multocida* against antibiotics are necessary to establish accurate treatments and to monitor antimicrobial resistances.

Results: Seventy-six isolates of *P. multocida* type B from pigs and cattle with acute septicemia were tested for susceptibility to 10 different antimicrobials. Bovine isolates were susceptible to all the antibiotics we tested except for lincomycin (94.4% of isolates were resistant). However, the antimicrobials we tested were less effective against swine isolates, of which none were susceptible to lincomycin. Furthermore, 29.3% swine isolates were resistant to tetracycline, 27.6% to penicillin, 20.7% to oxytetracycline, 17.3% to chloramphenicol, 15.5% to gentamicin, and 3.4% to enrofloxacin; no resistance to ceftiofur was detected. No multidrug resistant isolates were detected from cattle, while 25.86% of swine isolates were resistant to three or more antibiotic classes.

Conclusions: In this study, the lower resistance rates and multidrug resistant isolates reported for *P. multocida* type B derived from cattle compared to those

isolated from pigs may be related to the increased use of antibiotics in the porcine industry in Spain. Lincomycin is not recommended for the treatment of acute septicemia in pigs or cattle, rather, the use of ceftiofur, enrofloxacin, or gentamicin is indicated as an emergency treatment in the early stages of disease; once the susceptibility results are known, the use of tetracyclines, penicillin, or chloramphenicol should be prioritized. The increase in multidrug resistant isolates and antimicrobial resistance rates indicates that more attention should be paid to prevention as well as the responsible use of antibiotics.

Keywords: *Pasteurella multocida*, type B, antimicrobial susceptibility, resistance, hemorrhagic septicemia.

Introduction

Even though *Pasteurella multocida* is commonly present in the upper respiratory tract of domestic and wild species and it is considered an opportunistic agent, this microorganism is, in fact, the primary etiological cause of a wide range of diseases with global economic importance (Harper et al., 2006). *Pasteurella multocida* affects a broad range of hosts and causes many diseases including pneumonia in pigs, cattle, small ruminants, and rabbits, acute septicemia in cattle and buffalo, atrophic rhinitis in swine, and fowl cholera in poultry (Glimour, 1978; Rimler and Brogden, 1986; De Alwis, 1992; Ewers et al., 2006).

The acute septicemia caused by *P. multocida* is associated with hemorrhagic septicemia (HS), a severe disease which involves the capsular types B and E of this microorganism (De Alwis, 1992). This disease is endemic in some areas of Asia and Africa and commonly affects cattle and buffalo, being infrequently reported in pigs (Townsend et al., 1998b). However, sporadic outbreaks of HS affecting pigs have been described in limited geographic areas including India (Verma, 1988), Sri Lanka (Gamage et al., 1995), Vietnam (Townsend et al., 1998b), and Australia (Mackie et al., 1992).

Capsular type B of *P. multocida* causing acute septicemia has recently emerged in Europe. The first outbreak of HS caused by this agent was reported in 2009 in Spain and affected Iberian pigs from seven herds reared in an extensive farm system (Borge et al., 2011). Since then, several authors have described periodic outbreaks of acute septicemia in Iberian pigs (Cardoso-Toset et al., 2013), wild boar (Risco et al., 2013) and cattle (Cuevas et al., 2016.) in Spain. Additionally,

sporadic outbreaks of HS in pigs and cattle have also recently been reported in Hungary (Ujvári et al., 2015; Magyar et al., 2017).

Antimicrobial therapy is still proven to be effective in the treatment of diseases caused by *P. multocida*, including HS. The etiological treatment of this disease is based on the parenteral administration of antibiotics (e.g., penicillin, ampicillin, tetracycline, chloramphenicol, streptomycin, or neomycin), which are only effective in affected animals in the early stages of disease (De Alwis, 1992; Shivachandra et al., 2011). However, the excessive and unreasonable use of antimicrobials has accelerated the selective pressure put on the expression of genes encoding resistance in these microorganisms thus, increasing the emergence of resistant isolates (Kehrenberg et al., 2001). Indeed, an increase in the incidence of multidrug resistant (MDR) pathogenic bacteria has been reported in recent decades (Tang et al., 2009) and that is decreasing the efficacy of currently available antibiotics used to treat infectious diseases in food-producing animals.

Moreover, antimicrobial resistance has an impact on public health because of the potential for zoonotic bacteria to pass onto humans through the food chain (Walsh and Fanning, 2008). The growing concern about the increase in antimicrobial resistances has meant that national and international action has been taken to monitor, harmonize, and prudently use antibiotics (WHO, 2015). The World Organisation for Animal Health (OIE) and World Health Organisation (WHO) have each developed a list of critically important antimicrobial agents in veterinary medicine and human medicine, respectively (OIE; WHO, 2016).

The proper use of antibiotics to control pasteurellosis will require the completion of detailed surveys in several geographical areas (Kehrenberg et al., 2001). Furthermore, because of the recent emergence and circulation of *P. multocida* type B in Europe and the lack of studies regarding the response of this capsular type to antibiotics, its antimicrobial susceptibility profile must be determined in order to establish accurate treatments and to detect and monitor antibiotic resistances.

Material and methods

Bacterial isolates and identification

A total of 76 *P. multocida* type B isolates (58 from porcine and 18 from bovine) were evaluated in this study. The isolates were collected between 2009 and 2015 from different outbreaks of acute septicemic pasteurellosis that caused a high mortality rate in pigs and cattle located in 11 different extensively reared systems. Only isolates identified as *P. multocida* type B were assessed in the study. For this purpose, samples were plated on blood agar (Oxoid®) supplemented with 5% defibrinated sheep blood and incubated at 37°C for 24 hours under microaerobic conditions. The initial identification was done based on phenotypic and biochemical properties and was further confirmed by detection of the *kmt1* gene in a species-specific PCR assay (Townsend et al., 1998a). The capsular type was determined using the PCR assay protocol described by Townsend et al. 2001, and the biovar was assessed based on the production of the enzyme ornithine decarboxylase, urease activity, and fermentation of seven different carbohydrates (Fegan et al., 1995; Blackall et al., 1997).

Antimicrobial susceptibility evaluation

All *P. multocida* type B isolates were tested for their antimicrobial susceptibility based on their minimal inhibitory concentration (MIC). *Staphylococcus aureus* (ATCC® 29213; (Institute), 2013b) was used as a quality-control strain, and its MIC value ranges are shown in Table 1.

Table 1. MIC value ranges for the ATCC® 29213 *Staphylococcus aureus* quality control strain.

Antibiotic	Acceptable MIC value range (µg/mL)
Erythromycin	0.25–1
Lincomycin	ND
Neomycin	ND
Penicillin	0.25–2
Oxytetracycline	0.12–1 ^a
Tetracycline	0.12–1
Gentamicin	0.12–1
Enrofloxacin	0.03–12
Ceftiofur	0.25–1
Chloramphenicol	2–16

^a Reference value for tetracycline. ND = non-determined value according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; 2013).

The assays were carried out according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (VET01-A4 performance standards, CLSI, 2013b). This quantitative, in vitro method tests susceptibility to antimicrobials at different dilutions in microdilution plates inoculated by adding 100 µl of each isolate. In this

study we tested 10 antimicrobial agents (Vetranal, Sigma-Aldrich®): erythromycin, lincomycin, neomycin, penicillin, oxytetracycline, tetracycline, gentamicin, enrofloxacin, ceftiofur, and chloramphenicol. These drugs are widely used by field veterinarians in pigs and cattle and were recommended on the technical hemorrhagic septicemia card provided by the World Organization of Animal Health (OIE, 2013).

The inoculum from each isolate was prepared from colonies that had been plated on blood agar; isolates with a spectrophotometric absorbance at 625 nm of 0.08 to 0.13 were used (CLSI, 2013b). The inoculum was diluted on a microplate panel and these were fixed with adhesive seals and incubated at $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 12 ± 2 hours. The MIC was defined as the first dilution at which no visible growth of the isolate was detected in the presence of the antimicrobial being tested. The MICs for lincomycin, penicillin, oxytetracycline, tetracycline, gentamicin, enrofloxacin, and ceftiofur were interpreted using the break points provided by the CLSI guidelines (CLSI, 2013a). No break point values for *P. multocida* were available for erythromycin or neomycin (Tables 3 and 4). *Pasteurella multocida* isolates resistant to three or more different antimicrobial classes were defined as MDR isolates (Schwarz et al., 2010). The MIC₅₀ and MIC₉₀ were the MICs that inhibited the growth of 50 or 90 per cent of the isolates, respectively.

Statistical analysis

Statistical testing was performed with the SPSS software package, version 25.0 (IBM Corp., Armonk, NY). The resistance rates of isolates from both hosts studied as well as MDR isolates were compared using X^2 tests. In any category where

$n \leq 5$, Fisher's exact test was used. In all cases, p values of ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Results

Seventy-six isolates from swine ($n = 58$) and cattle ($n = 18$) affected with acute septicemic pasteurellosis caused by *P. multocida* type B, biovar 3 were tested for susceptibility to 10 different antimicrobial agents. The percentage of isolates which were susceptible, intermediate, or resistant to each antibiotic are listed in Table 2 and their MIC distribution as well as MIC₅₀ and MIC₉₀ are shown in Tables 3 and 4.

Table 2. Antibiotic susceptibility frequencies of 76 *Pasteurella multocida* type B isolates.

Antimicrobial agent	Susceptibility frequencies (%) to individual antibiotic								
	Swine ($n = 58$)			Cattle ($n = 18$)			Total ($n = 76$)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
ENR	86.2	6.9	6.9	94.4	5.6	0	88.2	6.6	5.3
CEF	98.3	1.7	0	100	0	0	98.7	1.3	0
GEN	84.5	0	15.5	100	0	0	88.2	0	11.8
C	81.0	1.7	17.3	100	0	0	85.5	1.3	13.2
LIN	0	0	100	5.6	0	94.4	1.3	0	98.7
PEN	72.4	0	27.6	72.2	22.2	5.6	72.4	5.3	22.4
OXY	77.6	1.7	20.7	100	0	0	82.9	1.3	15.8
TE	58.6	12.1	29.3	94.4	5.6	0	67.1	10.5	22.4
ERY	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NEO	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

C = chloramphenicol; CEF = ceftiofur; ENR = enrofloxacin; ERY = erythromycin; GEN = gentamicin; I = intermediate; LIN = lincomycin; ND = non-determined value; NEO = neomycin; OXY = oxytetracycline; PEN = penicillin; S = susceptible; R = resistant; TE = tetracycline.

Most isolates were susceptible to the antimicrobial agents tested, except for lincomycin: 100% of porcine isolates and 94.4% of bovine isolates were resistant to this drug. There was no evidence of any resistance to enrofloxacin, ceftiofur, gentamicin, chloramphenicol, oxytetracycline, or tetracycline in bovine isolates. Bacteria isolated from cattle only showed a high percentage of resistance to lincomycin, with low levels of resistance to penicillin (5.6%). Regarding the porcine isolates, 29.3% were resistant to tetracycline, 27.6% to penicillin, 20.7% to oxytetracycline, 17.3% to chloramphenicol, and 15.5% to gentamicin. A small number of isolates were resistant to enrofloxacin (6.9%) while no resistance to ceftiofur was detected.

Table 3. MIC value distribution of *Pasteurella multocida* type B isolates derived from swine ($n = 58$)

Break point	Ab	Number of isolates for each MIC ($\mu\text{g/mL}$)										MIC ₅₀	MIC ₉₀	%R
		≤ 0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	≥ 16			
≥ 1	ENR	45	2	2	1	4	3	0	1	0	0	≤ 0.03	0.5	6.9
≥ 8	CEF	39	3	0	1	4	7	3	1	0	0	≤ 0.03	1	0
> 8	GEN	0	0	0	0	0	3	11	16	19	9	4	≥ 16	15.5
≥ 32	C	0	0	0	2	29	6	3	3	4	$> 11^c$	0.5	≥ 16	17.2
> 2	LIN	0	0	0	0	0	0	0	0	6	52	≥ 16	≥ 16	100
≥ 1	PEN	10	12	17	3	0	0	16	0	0	0	0.125	2	27.6
$\geq 2^a$	OXY	4	3	6	26	6	1	2	1	9	0	0.25	8	20.7
≥ 2	TE	3	0	6	16	9	7	7	3	7	0	0.5	8	29.3
ND	ERY	0	0	2	2	3	8	1	8	0	34	≥ 16	≥ 16	ND
ND ^b	NEO	0	0	0	0	0	1	6	14	20	17	8	≥ 16	ND

^a breakpoint reference value for tetracycline; ^b breakpoint value for *P. multocida* derived from dogs; ^c MIC value = 32 $\mu\text{g/mL}$. Ab = antibiotic; C = chloramphenicol; CEF = ceftiofur; ENR = enrofloxacin; ERY = erythromycin; GEN = gentamicin; LIN = lincomycin; MIC = minimum inhibitory concentration; ND = non-determined value for *P. multocida* according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; 2013); NEO = neomycin; OXY = oxytetracycline; PEN = penicillin; R = Resistance; TE = tetracycline.

The resistance rates of penicillin ($p = 0.05$) and oxytetracycline ($p = 0.035$) were significantly higher in swine than in cattle. There was no statistical difference in the rest of antimicrobial agents tested between both host species.

Table 4. MIC value distribution of *Pasteurella multocida* type B isolates derived from cattle ($n = 18$)

Break point	Ab	Number of isolates for each MIC ($\mu\text{g/mL}$)										MIC ₅₀	MIC ₉₀	%R
		≤ 0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	≥ 16			
≥ 1	ENR	16	1	0	0	1	0	0	0	0	0	≤ 0.03	0.06	0
≥ 8	CEF	16	0	1	0	0	1	0	0	0	0	≤ 0.03	0.125	0
> 8	GEN	1	0	0	1	0	0	10	6	0	0	2	4	0
≥ 32	C	0	0	0	0	17	1	0	0	0	0	0.5	0.5	0
> 2	LIN	0	0	0	0	0	0	1	0	6	11	≥ 16	≥ 16	94.4
≥ 1	PEN	1	10	1	1	4	1	0	0	0	0	0.06	0.5	5.6
≥ 8	OXY	2	2	1	10	3	0	0	0	0	0	0.25	0.5	0
≥ 8	TE	1	0	2	6	1	5	2	1	0	0	0.25	2.0	0
ND	ERY	0	0	1	6	3	0	0	0	0	8	0.5	≥ 16	ND
ND	NEO	0	1	0	0	1	0	0	14	2	0	0.4	8	ND

^a breakpoint reference value for tetracycline; ^b breakpoint value for *P. multocida* derived from dogs.

Ab = antibiotic; C = chloramphenicol; CEF = ceftiofur; ENR = enrofloxacin; ERY = erythromycin; GEN = gentamicin; LIN = lincomycin; MIC = minimum inhibitory concentration; ND = non-determined value for *P. multocida* according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; 2013); NEO = neomycin; OXY = oxytetracycline; PEN = penicillin; R = Resistance; TE = tetracycline.

The resistance rates to erythromycin and neomycin could not be determined in any of the isolates because the break points of these drugs for *P. multocida* isolates have not yet been defined in the CLSI criteria. The MIC values for porcine and bovine isolates ranged between 0.125 and $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ for erythromycin, and most swine isolates (34/58) had a MIC value $\geq 16 \mu\text{g/mL}$. For neomycin, the MIC values of porcine isolates were between 1 and $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ and were from 0.06 to $8 \mu\text{g/mL}$.

for bovine isolates. Interestingly, swine and bovine isolates had the same MIC₅₀ values for enrofloxacin (≤ 0.03 µg/mL), ceftiofur (≤ 0.03 µg/mL), chloramphenicol (0.5 µg/mL), lincomycin (≥ 16 µg/mL), and oxytetracycline (0.25 µg/mL). However, the MIC₅₀ was higher in swine isolates than in bovine isolates for gentamicin, penicillin, erythromycin, and neomycin. More marked differences were found in the MIC₉₀ values, which were higher for the porcine isolates than for the bovine ones, except for lincomycin and erythromycin (≥ 16 µg/mL in both hosts). The distribution of the antimicrobial susceptibility patterns for *P. multocida* type B isolates from swine and cattle are summarized in Table 5.

Table 5. Patterns of antimicrobial resistance of *P. multocida* isolates from swine and cattle.

Patterns of antimicrobial resistance	Antibiotic classes (n)	Porcine isolates (n)	Bovine isolates (n)	Total isolates (n)
LIN	1	37	14	51
PEN	1	0	1	1
C-LIN	2	1	0	1
ENR-LIN	2	1	0	1
LIN-PEN	2	1	0	1
LIN-TE	2	3	3	6
GEN-LIN-PEN	3	1	0	1
LIN-PEN-TE	3	2	0	2
LIN-PEN-OXY-TE ^a	3	2	0	2
C-LIN-PEN-OXY-TE ^a	4	2	0	2
GEN-LIN-PEN-OXY-TE ^a	4	1	0	1
GEN-C-LIN-PEN-OXY-TE ^a	5	6	0	6
ENR-GEN-C-LIN-PEN-OXY-TE ^a	6	1	0	1

^a OXY-TE: OXY and TE belong to the same group of antibiotics. C = chloramphenicol; CEF = ceftiofur; ENR = enrofloxacin; ERY = erythromycin; GEN = gentamicin; LIN = lincomycin; NEO = neomycin; OXY = oxytetracycline; PEN = penicillin; TE = tetracycline.

Of note, all the isolates from both species were resistant at least to one of the 10 drugs we tested. While no MDR strains were found for the bovine isolates, 25.86% of the porcine isolates were multiresistant ($p = 0.016$). In addition, lincomycin and penicillin resistance were present in all the MDR patterns we identified.

Discussion

To the best of our knowledge, this study represents the first research performed in Europe about the antimicrobial susceptibility of capsular type B *P. multocida* derived from clinical samples from pigs and cattle affected with acute septicemia. However, the antimicrobial susceptibility of capsular types A and D from porcine isolates have been previously discussed (Table 6) in Spain (Lizarazo et al., 2006; Petrocchi-Rilo et al., 2019), China (Tang et al., 2009), Brazil (Furian et al., 2016), and Korea (Oh et al., 2018). In addition, other authors have studied antimicrobial resistance rates in *P. multocida* isolates from cattle in Europe (El Garch et al., 2016) and the United States (Timsit et al., 2017).

The sale of veterinary antibiotics in Spain is among the highest in Europe (EFSA, 2017). To promote the prudent use of antibiotics, antimicrobial resistances must first be detected and monitored. This data must then be made available to veterinarians so that they can implement effective therapies. Furthermore, it is important to define the antimicrobial susceptibility profile of type B *P. multocida* so that acute pasteurellosis can be treated as early as possible with effective antibiotics.

Table 6. Resistance rates found in other publications compared to the results of this study.

Ab	Lizarazo et al. 2006		Petrocchi-R et al. 2019	Tang et al. 2009	Furian et al. 2016	El Garch et al. 2016	Timsit et al. 2017	Oh et al. 2018	This study	
	1987–1988	2003–2004							Swine	Bovine
ENR	0	0	0	–	22.5	0	0	2.6	6.9	0
CEF	0	0	0	0	22.5	0	0	0.2	0	0
GEN	0	0	–	13.7	2.5	–	–	3.3	15.5	0
C	1.6	0.7	0	2.6	–	–	–	–	17.2	0
LIN	–	–	–	96.6	–	100	–	–	100	94.4
PEN	1.6	3.8	–	–	–	–	0	5.5	27.6	5.6
AMP	1.6	3	40.6	–	–	–	–	4.8	–	–
OXY	1.6	14.4	–	–	–	–	–	66.5	20.7	0
TE	–	–	18.8	58	40	20.4	83	–	29.3	0
ERY	1.6	3.8	12.5	6	40	–	–	–	ND	ND
NEO	1.6	0	–	ND	–	–	–	ND	ND	ND

Ab = antibiotic; C = chloramphenicol; CEF = ceftiofur; ENR = enrofloxacin; ERY = erythromycin; GEN = gentamicin; LIN = lincomycin; ND = non-determined value; NEO = neomycin; OXY = oxytetracycline; PEN = penicillin; TE = tetracycline; – = antimicrobial agent not tested by these authors.

In our study, 18 *P. multocida* type B isolates from diseased cattle were highly susceptible to all the antibiotics we tested, except for lincomycin (94.4% of the isolates were resistant). The MIC values for this antimicrobial agent varied from 2 to ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ and the MIC₅₀ and MIC₉₀ were both ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$. These values exceeded the break point (>2 $\mu\text{g/mL}$), indicating the presence of antimicrobial resistance to this drug. Compared to our work, other authors who studied *P. multocida* isolated from cases of pneumonia from across Europe (El Garch et al., 2016), found higher MIC values (between 16 and 64 $\mu\text{g/mL}$) in bovine isolates, with the MIC for most isolates being 32 $\mu\text{g/mL}$.

Timsit et al. 2017 also described higher resistance rates in *P. multocida* isolates from a Canadian feedlot (83% of these isolates were resistant to oxytetracycline), both from healthy cattle and those affected with bovine respiratory disease. However, oxytetracycline and other antibiotics were used at this feedlot before the enrollment, which may help to explain these results. Even so, in agreement with our results, these authors found no resistances to ceftiofur or enrofloxacin. The absence or low levels of antibiotic resistances we found for type B bovine *P. multocida* in this study might be expected because this pathogen has only recently emerged in cattle in Spain (Cuevas et al., 2016.), meaning that this type have been subjected to very little selective pressure to date. In addition, so far, *P. multocida* type B has only been detected in animals reared in extensive systems.

The same as our findings in cattle, lincomycin was completely ineffective against type B *P. multocida* derived from porcine isolates. The MIC values of this drug varied from 8 to ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ in pigs and the MIC₅₀ and MIC₉₀ were both ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$. Lincomycin resistance has previously been reported in *P. multocida* type A or D isolates from pigs in China (Tang et al., 2009) with 96.6% of isolates resistant to this antibiotic and an MIC₅₀ of 8 $\mu\text{g/mL}$ and MIC₉₀ of 32 $\mu\text{g/mL}$ reported. Lincomycin has not yet been tested in this context in Spain, although some authors have researched resistance to clindamycin, an antibiotic from the same family of antimicrobials. Petrocchi-Rilo et al. (Petrocchi-Rilo et al., 2019) found 96.9% resistance (31/32 isolates) to clindamycin, while El Garch et al. (El Garch et al., 2016) described in Europe MIC values to lincomycin between 4 and 64 $\mu\text{g/mL}$ in porcine isolates (the mode value was 32 $\mu\text{g/mL}$). According to the break point specified by the CLSI for lincomycin, all isolates from El Garch et al. 2016 would

have been classified as resistant. The low activity of lincosamides against *Pasteurellaceae* is well known (Giguère et al., 2013) and the selection of this antimicrobial in the study reflects in the number of MDR patterns identified. According to our data and these previously published results, the use of antimicrobials in the lincosamides family is unlikely to effectively treat cattle or pigs affected with *P. multocida* and thus, is not recommended.

In Spain, the rate of resistance to tetracyclines did not excessively increase from 2004 (14.4%) to 2018 (18.8%) for type A or D *P. multocida* isolates from pigs (Petrocchi-Rilo et al., 2019). Here, we found that 29.3% and 20.7% of *P. multocida* type B isolates from pigs were resistant to tetracycline and oxytetracycline, respectively. According to previous authors, the resistance rate of *P. multocida* isolates to tetracycline in Europe and Australia (between 11.5% and 32.2%) were the highest from among several antimicrobials tested (El Garch et al., 2016). Higher resistance values of *P. multocida* A and D to tetracycline (58%; (Tang et al., 2009) and oxytetracycline (66.5%; (Oh et al., 2018) in China and Korea have been reported compared with this study, which may be related to the heavy use of antimicrobials in these countries compared to the European Union, especially in the pig industry (Oh et al., 2018). Furian et al. 2016 also found high resistance values to tetracycline in Brazil with 40% of the type A or D *P. multocida* isolates from pigs being resistant to this drug.

β -lactams are widely used in the treatment and prevention of swine respiratory tract diseases. This group of antibiotics showed high efficacy (>96% susceptibility) against *P. multocida* type A or D from swine 15 years ago in Spain (Lizarazo et al., 2006). However, their wide use has exerted selective resistance pressure on

pathogens so that *P. multocida* isolates from pigs in Spain currently have a resistance value to penicillin and ampicillin of 27.6% (in this study) and 40.6% (Petrocchi-Rilo et al., 2019), respectively. The lower percentage of *P. multocida* type B isolates to penicillin compared to isolates of capsular type A (Petrocchi-Rilo et al., 2019) may be due to acute septicemia has appeared in Spain relatively recently so that *P. multocida* type B has received lower antibiotic pressure. In contrast, β -lactams remain effective in Korea where, according to one report, only 5.5% of *P. multocida* isolates from pigs were resistant to penicillin and 4.8% were resistant to ampicillin (Oh et al., 2018).

Chloramphenicol may cause adverse effects in humans and it is only recommended when safer antimicrobials cannot be used. Though previous authors found a high level of susceptibility (<3% of isolates were resistant) to this drug (Lizarazo et al., 2006; Tang et al., 2009; Sarangi et al., 2015; Petrocchi-Rilo et al., 2019), in our study 17.3% of *P. multocida* type B isolates from swine were resistant to it. In agreement with our results, a study carried out in Korea indicated that 18.5% of type A or D *P. multocida* isolates from pigs were resistant to florfenicol (Oh et al., 2018). This drug, a phenicol used widely in veterinary medicine to treat pneumonia caused by *P. multocida*, belongs to the same antimicrobial group as chloramphenicol. Indeed, previous authors have found florfenicol to be highly effective (Dayao et al., 2014). Likewise, gentamicin exhibited moderate activity against the swine isolates we tested in this study (84.5% were susceptible). Similar results were reported by Tang et al. (Tang et al., 2009) who found 86.3% of their isolates were susceptible to this antibiotic, although other authors have described lower resistance rates (<3.3%) to gentamicin in *P.*

multocida isolates (Lizarazo et al., 2006; Sarangi et al., 2015; Furian et al., 2016; Oh et al., 2018).

Enrofloxacin and ceftiofur seemed to have the highest in vitro activity against the isolates we tested: only 4 of 58 (6.9%) of the *P. multocida* type B isolates from pigs that we tested were not susceptible to enrofloxacin, and all of them were vulnerable to ceftiofur. This finding is in accordance with a situation that has remained constant in Spain since 1987 (Lizarazo et al., 2006; Petrocchi-Rilo et al., 2019). Additionally, research carried out in Europe between 2009 and 2012 with total of 152 *P. multocida* isolates from pigs failed to find any that were resistant to ceftiofur or enrofloxacin (El Garch et al., 2016). Moreover, high susceptibility rates to these drugs have been reported for *P. multocida* isolates from pigs in China or Korea (Tang et al., 2009; Oh et al., 2018). However, Brazilian authors reported that in both cases, 22.5% of their swine isolates were resistant to enrofloxacin and ceftiofur (Furian et al., 2016). Although ceftiofur, enrofloxacin, and gentamicin are highly effective antibiotics against *P. multocida*, according to the OIE and WHO, cephalosporins (3rd, 4th, and 5th generation), macrolides, and aminoglycosides are critically important antibiotics for human medicine and animal health (OIE; WHO, 2016). Therefore, their use is only recommended as an emergency treatment in the early stages of HS, until the susceptibility test results are known.

We were unable to determine the resistance rates of erythromycin and neomycin in this study because no break points for *P. multocida* have been defined by the CLSI for these drugs. The MIC values for erythromycin for the isolates tested from both hosts in this research were between 0.125 and ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$, and in most cases (42/76) were ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$. Tang et al. (Tang et al., 2009) used 8 $\mu\text{g/mL}$ as the break

point for this macrolide; thus, applying this break point to the type B *P. multocida* isolates we used in this current study would have meant that 58.6% of those from pigs and 44.4% from cattle would have been classified as resistant to erythromycin. Some authors have reported moderate susceptibility to this drug (Sarangi et al., 2015; Petrocchi-Rilo et al., 2019) and, in other research, 40% of *P. multocida* isolates from pigs were resistant to erythromycin (Furian et al., 2016). Additionally, in our research team, the susceptibility of 25 swine *P. multocida* type B isolates against tildipirosin was tested, finding that this macrolide inhibited the growth of more than 80% of the isolates (Borge et al., 2017). In our study, the MIC₅₀ and MIC₉₀ values for erythromycin (both ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$) were higher than those described by previous authors at 2 $\mu\text{g/mL}$ and 4 $\mu\text{g/mL}$ for MIC₅₀ and MIC₉₀, respectively (Lizarazo et al., 2006; Tang et al., 2009). The MIC values for neomycin in this current study were between 1 and ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ for swine isolates and 0.006 and 8 $\mu\text{g/mL}$ for bovine isolates, and the MIC₅₀ and MIC₉₀ of the swine isolates were similar to those described previously in type A or D *P. multocida* isolates from swine (Lizarazo et al., 2006; Tang et al., 2009; Oh et al., 2018).

Multidrug resistance has increased over time, partly because of the widespread use of antimicrobials in human and veterinary medicine and antibiotic additives used in animal feed (Tang et al., 2009). Additionally, the horizontal transfer of genes through different bacterial species promotes MDR development (Walsh and Fanning, 2008). Lizarazo et al. 2006 reported 7.93% of their isolates studied between 1987 and 1988 to be resistant to, at least, four antimicrobials; some years later, the resistance to the same antimicrobials had risen to 61.9% in isolates studied between 2003 and 2004. In China, previous authors have described an

increase in the prevalence of isolates resistant to more than five antibiotics (from 47.8% in 2003 to 97.1% in 2007) or more than seven antibiotics (from 16.2% in 2003 to 62.8% in 2007) (Tang et al., 2009). Of note, there was a sharp increase in the prevalence of MDR among capsular types A and D *P. multocida* isolates from pigs. In the current study, while no MDR could be found in capsular type B isolates from cattle, 25.86% of those from pigs were resistant to three or more antibiotic classes.

Perhaps the high rate of resistance and number of MDR isolates found for swine in our study can be explained by the more intensive use of antibiotics in the pig industry compared to the cattle industry in Spain. The official European JIACRA (joint inter-agency antimicrobial consumption and resistance analysis) report indicates that while antibiotic consumption for cattle—expressed in mg/PCU (population correction unit)—in Spain was around 900 mg/PCU between 2010 and 2016, in pigs it was more than 3,500 mg/PCU. This report also states that 58.51% of β -lactams were used in the pig industry while 28.43% were used in ruminants; in the case of tetracyclines, 58% were used in the pig industry and only 14% in ruminants. In agreement with other studies which highlighted tetracycline and lincomycin as the antimicrobials most commonly involved in resistance patterns (Tang et al., 2009; Oh et al., 2018), lincomycin, penicillin, and tetracycline were most frequently included in the resistance patterns we observed here.

Conclusions

In this study we reported a lower in vitro resistance rates of *P. multocida* type B as well as a lower prevalence of MDR in type B isolates from cattle, compared to those isolated from pigs. This can be explained by the extensive use of antibiotics in the pig industry in Spain. Lincosamides showed poor activity against all types of *P. multocida* isolates and, therefore, its use is not recommended for treating diseases in cattle or pigs caused by this pathogen. Based on the susceptibility of *P. multocida* type B isolates in this study, the use of ceftiofur, enrofloxacin, or gentamicin is preferable as an emergency treatment in the early stages of HS until susceptibility test results are known, and thereafter, therapeutic or metaphylactic treatments with tetracycline, oxytetracycline, penicillin, or chloramphenicol should be prioritized accordingly. The rapid increase of resistance in *P. multocida* against important groups of antimicrobial agents indicates that more attention should be paid to disease prevention and the responsible use of antibiotics, especially those which are important to human health, in order to limit the emergence and spread of antibiotic-resistant bacteria in humans and animals.

Acknowledgements

The authors would like to extend their thanks to all the farmers and clinical veterinarians involved for providing samples from diseased animals, as well as the staff at the Cordoba University Animal Health Department.

References

- Informe JIACRA España. Primer análisis integrado del consumo de antibióticos y su relación con la aparición de resistencia. <http://www.resistenciaantibioticos.es/es/publicaciones/informe-jiacra-espana> 04 Jun 2018).
- OIE, 2013: Haemorrhagic Septicaemia: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/HAEMORRHAGIC_SEPTICEMIA.pdf
- Blackall, P. J., J. L. Pahoff, and R. Bowles. 1997. Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian pigs. *Veterinary Microbiology* 57(4):355-360. (Article) doi: 10.1016/s0378-1135(97)00111-9
- Borge, C., I. Barranco, J. M. Márquez del Cid, M. A. Rodríguez-Guerra, A. Carbonero, L. Carrasco, and A. Perea. 2011. Outbreak of acute septicaemia by *Pasteurella multocida* type B in pigs reared in extensive system in Spain. In: 3rd European Symposium of Porcine Health and Management (ESPHM). Espoo, Finland. p 127.
- Borge, C., I. Cuevas, M. A. Rodríguez-Guerra, A. Carbonero, and A. Perea. 2017. Tildipirosin subcectibility of *Pasteurella multocida* Type A, Type B and *Erysipelothrix rhusiopathiae* associated with acute mortality in swine., 9th European Symposium of Porcine Health Management (ESPHM). Prague.
- Cardoso-Toset, F., J. Gomez-Laguna, M. Callejo, A. I. Vela, L. Carrasco, J. F. Fernandez-Garayzabal, A. Maldonado, and I. Luque. 2013. Septicaemic pasteurellosis in free-

- range pigs associated with an unusual biovar 13 of *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology* 167(3-4):690-694. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.08.005
- Cuevas, I., I. Pacheco, J. C. Marín, A. Carbonero, D. Cano, I. García-Bocanegra, and C. Borge. 2016. Brote de septicemia hemorrágica por *Pasteurella multocida* B:3 en una explotación de bovino extensivo. In: XII Congreso Internacional Anembe de Medicina Bovina., Santiago de Compostela, Spain.
- Dayao, D. A., J. S. Gibson, P. J. Blackall, and C. Turni. 2014. Antimicrobial resistance in bacteria associated with porcine respiratory disease in Australia. *Vet Microbiol* 171(1-2):232-235. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.03.014
- De Alwis, M. C. 1992. Haemorrhagic septicaemia--a general review. *Br Vet J* 148(2):99-112. doi: 10.1016/0007-1935(92)90101-6
- EFSA. 2017. EMA and EFSA joint scientific opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety (RONAFA). *EFSA Journal*, 15, 4666.
- El Garch, F., A. de Jong, S. Simjee, H. Moyaert, U. Klein, C. Ludwig, H. Marion, S. Haag-Diergarten, A. Richard-Mazet, V. Thomas, and E. Siegwart. 2016. Monitoring of antimicrobial susceptibility of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe, 2009-2012: VetPath results. *Vet Microbiol* 194:11-22. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.04.009

- Ewers, C., A. Lubke-Becker, A. Bethe, S. Kiessling, M. Filter, and L. H. Wieler. 2006. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Veterinary Microbiology* 114(3-4):304-317. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.12.012
- Fegan, N., P. J. Blackall, and J. L. Pahoff. 1995. Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian poultry. *Veterinary Microbiology* 47(3-4):281-286. (Article) doi: 10.1016/0378-1135(95)00119-0
- Furian, T. Q., K. A. Borges, V. Laviniki, S. L. Rocha, C. N. de Almeida, V. P. do Nascimento, C. T. Salle, and H. L. Moraes. 2016. Virulence genes and antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolated from poultry and swine. *Braz J Microbiol* 47(1):210-216. doi: 10.1016/j.bjm.2015.11.014
- Gamage, L. N. A., T. G. Wijewardana, H. L. G. Bastiansz, and A. A. Vipulasiri. 1995. An outbreak of acute pasteurellosis in swine caused by serotype B:2 in Sri Lanka. . *Sri Lanka Veterinary Journal* 42:15-19.
- Giguère, S., Prescott JF, and D. PM. 2013. (Eds.), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (Fifth Ed), Wiley Balckwell, Ames, IA, USA. p 199-210.
- Glimour, N. J. 1978. Pasteurellosis in sheep. *The Veterinary Record* 102(5):100-102.
- Harper, M., J. D. Boyce, and B. Adler. 2006. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiol Lett* 265(1):1-10. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00442.x

- CLSI, 2013a. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. Document VET01-S., Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI, 2013b. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals; approved standard-Fourth Edition- document VET01-A4, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Kehrenberg, C., G. Schulze-Tanzil, J. L. Martel, E. Chaslus-Dancla, and S. Schwarz. 2001. Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. *Vet Res* 32(3-4):323-339. doi: 10.1051/vetres:2001128
- Lizarazo, Y. A., E. F. Ferri, A. J. de la Fuente, and C. B. Martín. 2006. Evaluation of changes in antimicrobial susceptibility patterns of *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* isolates from pigs in Spain in 1987-1988 and 2003-2004. *Am J Vet Res* 67(4):663-668. doi: 10.2460/ajvr.67.4.663
- Mackie, J. T., M. Barton, and J. Kettlewell. 1992. *Pasteurella multocida* septicaemia in pigs. *Aust Vet J* 69(9):227-228.
- Magyar, T., B. Ujvári, L. Szeredi, N. Virsinger, E. Albert, Z. Németh, E. Csuka, and I. Biksi. 2017. Re-emergence of bovine haemorrhagic septicaemia in Hungary. *Acta Vet Hung* 65(1):41-49. doi: 10.1556/004.2017.004
- Oh, Y. H., D. C. Moon, Y. J. Lee, B. H. Hyun, and S. K. Lim. 2018. Antimicrobial resistance of. *Vet Rec Open* 5(1):e000293. doi: 10.1136/vetreco-2018-000293

OIE. List of antimicrobial agents of veterinary importance.
https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/A_OIE_List_antimicrobials_July2019.pdf (Accessed July, 2019 2019).

Petrocchi-Rilo, M., C. B. Gutiérrez-Martín, J. I. Méndez-Hernández, E. F. Rodríguez-Ferri, and S. Martínez-Martínez. 2019. 3Antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolates recovered from swine pneumonia in Spain throughout 2017 and 2018. *Veterinary and Animal Science* 7:100044. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vas.2018.100044>

Rimler, R. B., and K. A. Brogden. 1986. *Pasteurella multocida* isolated from rabbits and swine: serologic types and toxin production. *American Journal of Veterinary Research* 47(4):730-737.

Risco, D., P. Fernández-Llario, J. M. Cuesta, W. L. García-Jiménez, M. Gil, P. Gonçalves, R. Martínez, L. Gómez, A. García, J. Rey, M. Hermoso de Mendoza, and J. H. Hermoso de Mendoza. 2013. Fatal outbreak of systemic pasteurellosis in a wild boar (*Sus scrofa*) population from southwest Spain. *J Vet Diagn Invest* 25(6):791-794. doi: 10.1177/1040638713504411

Sarangi, L. N., P. Thomas, S. K. Gupta, A. Priyadarshini, S. Kumar, V. K. Nagaleekar, A. Kumar, and V. P. Singh. 2015. Virulence gene profiling and antibiotic resistance pattern of Indian isolates of *Pasteurella multocida* of small ruminant origin. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 38:33-39. doi: 10.1016/j.cimid.2014.11.003

Schwarz, S., P. Silley, S. Simjee, N. Woodford, E. van Duijkeren, A. P. Johnson, and W. Gaastra. 2010. Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria

obtained from animals. J Antimicrob Chemother 65(4):601-604. doi: 10.1093/jac/dkq037

Shivachandra, S. B., K. N. Viswas, and A. A. Kumar. 2011. A review of hemorrhagic septicemia in cattle and buffalo. Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases 12(1):67-82. (; Review) doi: 10.1017/s146625231100003x

Tang, X., Z. Zhao, J. Hu, B. Wu, X. Cai, Q. He, and H. Chen. 2009. Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China. J Clin Microbiol 47(4):951-958. doi: 10.1128/JCM.02029-08

Timsit, E., J. Hallewell, C. Booker, N. Tison, S. Amat, and T. W. Alexander. 2017. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, and *Histophilus somni* isolated from the lower respiratory tract of healthy feedlot cattle and those diagnosed with bovine respiratory disease. Vet Microbiol 208:118-125. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.07.013

Townsend, K. M., J. D. Boyce, J. Y. Chung, A. J. Frost, and B. Adler. 2001. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. Journal of Clinical Microbiology 39(3):924-929. doi: 10.1128/jcm.39.3.924-929.2001

Townsend, K. M., A. J. Frost, C. W. Lee, J. M. Papadimitriou, and H. J. Dawkins. 1998a. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. J Clin Microbiol 36(4):1096-1100.

- Townsend, K. M., D. O'Boyle, T. T. Phan, T. X. Hanh, T. G. Wijewardana, I. Wilkie, N. T. Trung, and A. J. Frost. 1998b. Acute septicaemic pasteurellosis in Vietnamese pigs. *Veterinary Microbiology* 63(2-4):205-215. doi: 10.1016/s0378-1135(98)00233-8
- Ujvári, B., L. Szeredi, L. Pertl, G. Tóth, K. Erdélyi, S. Jánosi, T. Molnár, and T. Magyar. 2015. First detection of *Pasteurella multocida* type B:2 in Hungary associated with systemic pasteurellosis in backyard pigs. *Acta Vet Hung* 63(2):141-156. doi: 10.1556/AVet.2015.012
- Verma, N. D. 1988. *Pasteurella multocida* B:2 in haemorrhagic septicaemia outbreak in pigs in India. *Vet Rec* 123(2):63.
- Walsh, C., and S. Fanning. 2008. Antimicrobial resistance in foodborne pathogens--a cause for concern? *Curr Drug Targets* 9(9):808-815.
- WHO. 2016. Critically important antimicrobials for human medicine, 5th revision. <https://www.who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-fifth/en/>.
- WHO. 2015. Global action plan on antimicrobial resistance. http://www.wpro.who.int/entity/drug_resistance/resources/global_action_plan_en_g.pdf.

Capítulo IV

Conclusiones

CONCLUSIÓN 1.- La aparición de brotes de Septicemia Hemorrágica en el ganado porcino desde el año 2009 hasta la actualidad, hace pensar que esta enfermedad está presente de forma endémica en determinadas zonas del Suroeste de nuestro país. El patrón de presentación en el ganado porcino es: animales criados en extensivo, entre los 4 y los 8 meses de edad con una presentación sobreaguda-aguda del proceso. Son necesarios más estudios que determinen la implicación de otras especies en el mantenimiento de *P. multocida* tipo B en este ecosistema, así como la posible presencia de animales portadores aparentemente sanos entre la especie porcina.

CONCLUSIÓN 2.- El biovar 3 fue el único identificado entre los aislados de *Pasteurella multocida* tipo B caracterizados en este estudio, aunque trabajos previos describieron la presencia del biovar 13 en un brote de Septicemia Hemorrágica en España. Dado que ambos biovares sólo se diferencian fenotípicamente en base a la prueba de la ornitina descarboxilasa (positivo para el biovar 3 y negativo para el 13), recomendamos la utilización de técnicas moleculares que confirmen la presencia o ausencia del gen que codifica esta enzima, para una correcta caracterización del biovar de *P. multocida*.

CONCLUSIÓN 3.- Las bajas tasas de letalidad detalladas en el brote de Septicemia Hemorrágica descrito en 2015 en ganado bovino, se asocian a la aplicación de un tratamiento antibiótico temprano en los animales afectados, que a su vez, condicionó una elevada tasa de recuperación. La descripción de los brotes de Septicemia Hemorrágica en el ganado bovino en este estudio puede ser de utilidad para el diagnóstico presuntivo de esta enfermedad poco conocida

en España y la aplicación de tratamientos de forma precoz que reviertan en el bienestar de los animales y minimicen las pérdidas económicas en las explotaciones.

CONCLUSIÓN 4.- La totalidad de los aislamientos de *P. multocida* tipo B obtenidos a partir del ganado porcino y bovino presentaron los genes que codifican la adhesina PfhA, la sialidasa nanH y la superóxido dismutasa sodC . Además, se observó una alta conservación del gen *ompH* (100% y 94,4%, en ganado porcino y bovino respectivamente), *psl* (97,6% y 100%), *nanB* (85,4% y 94,4%) y *hgbA* (90,2% y 100%). Por el contrario, ningún aislado presentó los genes para la síntesis de proteínas de unión a la transferrina (*tbpA*), proteínas de unión a la hemoglobina (*hgbB*) o la toxina dermonecrótica (*toxA*). Es necesario realizar estudios en el futuro para comprender mejor las relaciones entre los genes, los tipos de cápsulas, los biovares y los hospedadores de *P. multocida*.

CONCLUSIÓN 5.- Hemos confirmado como la espectometría de masas MALDI-TOF representaba un método muy potente y conveniente para la rápida identificación de *P. multocida*. El método de transferencia directa es suficiente para generar espectros de buena calidad para su comparación con la base de datos de espectros de referencia, si bien, la extracción de proteínas mediante etanol y ácido fórmico, mejora significativamente la calidad de los espectros generados.

CONCLUSIÓN 6.- El ceftiofur, la enrofloxacin y la gentamicina se han mostrado, en condiciones in vitro, como los antibióticos más eficaces en frente a los aislados de *P. multocida* tipo B. Dado que la EMA (European Medicines

Agency) clasifica a estas sustancias bien como de “uso restringido” (ceftiofur y enrofloxacin) o para ser “usado con cautela” (gentamicina) recomendamos priorizar el uso de gentamicina en tratamientos de emergencia, ante la sospecha de brotes agudos de SH, administrándose de forma racional y exclusivamente en las primeras etapas de la enfermedad. Una vez que se conozcan los resultados de las pruebas de susceptibilidad y a partir de entonces, se debe dar prioridad a los tratamientos terapéuticos o metafilácticos con tetraciclina, oxitetraciclina, penicilina o derivados del cloranfenicol. Ceftiofur y enrofloxacin, deberán reservarse sólo para el tratamiento clínico cuando no existan antimicrobianos alternativos que puedan ser efectivos. Las lincosamidas mostraron escasa actividad frente a los aislados de *P. multocida* y por lo tanto, no se aconseja su uso, ni en el ganado porcino, ni en el ganado bovino.

CONCLUSIÓN 7.- Las menores tasas de resistencia in vitro de los aislados de *P. multocida* tipo B procedentes del ganado vacuno frente a todos los antibióticos testados, así como la ausencia de aislados multirresistentes entre las cepas bovinas, en comparación con los aislados porcinos (25,86%), puede explicarse por el elevado uso de antibióticos durante los pasados años en la industria porcina en España.

CONCLUSIÓN 8.- Los resultados de resistencia obtenidos en nuestro estudio frente a importantes grupos de antimicrobianos alertan de la importancia en la prevención y tratamiento de los procesos causados por *P. multocida* tipo B, teniendo presente el uso responsable de los antibióticos, a fin de limitar la aparición y la propagación de bacterias resistentes tanto en los seres humanos

como en los animales. Es necesaria una constante monitorización de la sensibilidad in vitro de estos aislados para determinar la evolución de sus resistencias, a fin de establecer un control eficaz de este patógeno implicado en infecciones graves en nuestra cabaña ganadera.

Capítulo V

Resumen

RESUMEN

La septicemia hemorrágica (SH) es una enfermedad infecciosa hiperaguda grave causada por *Pasteurella multocida* tipo B y E. Esta pasteurellosis sistémica afecta principalmente a ganado bovino y búfalos en países asiáticos y africanos, donde es endémica y causa cuantiosas pérdidas económicas. Sin embargo, en otros países y especies la SH es poco común y, por tanto, menos conocida. Varios países europeos, incluido España, han registrado brotes esporádicos de SH en ganado bovino, porcino y ungulados silvestres durante la última década. Si bien existen vacunas para controlar la SH, dada la heterogeneidad del agente causal, es necesaria la tipificación molecular de las diferentes cepas así como el conocimiento de su perfil de resistencia antimicrobiana para establecer el control de la enfermedad.

Los principales objetivos de este estudio fueron la descripción de los brotes de SH acontecidos en ganado porcino y del primero en bovino en España, la caracterización bioquímica, molecular de las cepas involucradas en dichos brotes y la determinación de su perfil de susceptibilidad antimicrobiana.

En este estudio, diferentes muestras post-mortem procedentes de 53 brotes en ganado porcino y del primer brote en ganado bovino, acontecidos entre 2009 y 2019, fueron analizadas. El signo clínico predominante los animales afectados de ambas especies fue un marcado edema en la región submandibular y ventral del cuello. En los hallazgos post-mortem destacó la presencia de múltiples hemorragias localizadas en todos los órganos. La identificación bioquímica y molecular de *P. multocida* tipo B, biovar 3, determinó la SH como la enfermedad causante de todos los brotes.

El estudio molecular de los aislados causantes de los brotes se realizó mediante nueve PCRs simples y múltiples. Se analizaron 14 genes relacionados con la virulencia de *P. multocida* (*ompH*, *oma87*, *psl*, *pfhA*, *ptfA*, *nanH*, *nanB*, *sodA*, *sodC*, *hgbA*, *hgbB*, *tbpA*, *exxBD-tonB* and *toxA*). La elevada prevalencia de los genes *ompH*, *psl*, *nanH*, *nanB*, *sodC* y *hgbA* en diferentes hospedadores y tipos capsulares de *P. multocida* podría indicar que dichos genes tienen mayor

relevancia en la patogénesis de dicho microorganismo. El gen *pfhA*, anteriormente relacionado con la SH en rumiantes, se detectó además en el cien por cien de los aislados porcinos en este estudio.

El estudio del perfil de sensibilidad antimicrobiana se realizó mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de diez antimicrobianos. Los aislados procedentes de ganado bovino mostraron elevados porcentajes de susceptibilidad a todos los antibióticos testados a excepción de la lincomicina, completamente inefectiva frente a los aislados de ambas especies. Los aislados procedentes de porcino presentaron mayores porcentajes de resistencia (entre el 15 y el 30%) que los procedentes de bovino a la mayoría de antibióticos testados. Únicamente la enrofloxacin y el ceftiofur mostraron escasos porcentajes de resistencia en los aislados de porcino. Las diferencias en cuanto a resistencias antibióticas del mismo patógeno en los distintos hospedadores podrían deberse al mayor uso de antibióticos en la industria porcina en España.

La presencia de brotes periódicos durante la última década en ganado criado en extensivo indica la posibilidad de que la SH sea endémica en ciertas áreas de España, donde puede estar subestimada. El conocimiento del curso y características de los brotes de SH podría evitar la confusión con otras enfermedades, facilitando el diagnóstico de esta enfermedad en la que el tratamiento temprano es fundamental. El gen *pfhA* parece estar relacionado con el tipo capsular B de *P. multocida* independientemente del hospedador o de su condición clínica, por lo que podría ser un elemento clave para el control futuro de dicho patógeno. El tratamiento más eficaz de la SH podría obtenerse con ceftiofur, enrofloxacin o gentamicina. Sin embargo, dichos antibióticos representan un grupo de importancia crítica para medicina humana de manera que quedarían restringidos a un uso de emergencia en las primeras fases de la enfermedad. Una vez conocido el perfil de susceptibilidad se priorizarían antibióticos como el cloranfenicol, la penicilina o las tetraciclinas para garantizar un tratamiento efectivo de la SH minimizando el desarrollo de resistencias bacterianas.

SUMMARY

Haemorrhagic septicaemia (HS) is an acute, severe infectious disease caused by capsular types B and E of *Pasteurella multocida*. This systemic pasteurellosis mainly affects cattle and buffaloes in Asian and African countries, where is an endemic disease and causes large economic losses. However, HS remains less known in other countries as its appearance is less common. Several European countries, including Spain, have reported sporadic HS outbreaks in cattle, swine and wildlife during the last decade. Despite the existence of HS vaccines, they have limitations due to the heterogenicity of the etiological agent. Therefore, it is essential the molecular characterization of the strains causing HS outbreaks as well as their antibiotic resistance profile determination to establish an effective control of this disease.

This study aimed to describe several HS outbreaks in swine and the first in cattle occurred in Spain, to characterize biochemical and molecularly the strains involved in these HS outbreaks, and to determine their antibiotic susceptibility profile.

Several post-mortem samples from 53 swine outbreaks and the first outbreak in cattle, occurred between 2009 and 2019, were analyzed in this study. The main clinical signs and post-mortem lesions in both host were a vast oedema in the ventral area of the neck as well as brisket regions and widespread haemorrhages in all organs. The etiological agent identification as *P. multocida* type B, biovar 3, determined HS as the cause of the outbreaks.

Molecular study of strains was performed through 9 simple and multiple PCRs. Fourteen virulence associated genes of *P. multocida* were analysed (*ompH*, *oma87*, *psl*, *pfhA*, *ptfA*, *nanH*, *nanB*, *sodA*, *sodC*, *hgbA*, *hgbB*, *tbpA*, *exbBD-tonB* and *toxA*). High prevalence of *ompH*, *psl*, *nanH*, *nanB*, *sodC* y *hgbA* genes in different hosts and capsular types of *P. multocida* could be indicative of their higher relevance in the pathogenesis of this microorganism. *pfhA* gene, previously related with HS in ruminants, was detected in all isolated from swine of this study.

The susceptibility study was performed through the determination of minimal inhibitory concentration (CMI) in 10 antibiotics commonly used in veterinary medicine. Bovine isolated showed high susceptibility against all antibiotic tested with exception of lincomycin, which resulted completely ineffective against all isolates from both hosts. Swine isolates had greater resistance percentages (between 15 and 30%) than bovine isolates in the majority of antibiotic tested. Enrofloxacin and ceftiofur were the only agents that resulted highly effective in porcine isolates. Differences in the resistance profile of the same etiological agent in different hosts may be due to the greater antibiotic use in the swine industry compared to bovine industry in Spain.

The onset of periodic outbreak in free-range livestock during the last decade make possible that HS could have become endemic in certain areas of Spain, where might be underestimated. The recognition of the HS outbreak course and characteristics could avoid confusion with other diseases, facilitating HS diagnosis. *pfhA* gene seems to be related with capsular type B of *P. multocida* regardless host specie or clinical status. Therefore, it would be a key gene for HS control. Ceftiofur, enrofloxacin or gentamicin had the most effective susceptibility results against *P. multocida* type B. However, these antibiotics are classified as highly important agents for human medicine so that their use would be restricted only to emergency treatment in the early onset of HS. Once the susceptibility result is known, should be prioritized chloramphenicol, penicillin or tetracyclines group to ensure an effective HS treatment minimizing the bacterial resistance trend.

Capítulo VI

Indicios de calidad



INDICIOS DE CALIDAD DE LA TESIS APORTADOS POR EL DOCTORANDO

CUEVAS GÓMEZ

APELLIDOS CUEVAS GÓMEZ		NOMBRE MARÍA INMACULADA	
D.N.I. o PASAPORTE 80162631H	TELÉFONO Fijo/Móvil 627638723	DOMICILIO C/ MARÍA JESÚS HERRUZO, 14	
CÓDIGO POSTAL 14440	LOCALIDAD VILLANUEVA DE CÓRDOBA	PROVINCIA CÓRDOBA	CORREO ELECTRÓNICO Inmacg.vet@hotmail.com

TÍTULO DE LA TESIS

ESTUDIO DE LAS SEPTICEMIAS CAUSADAS POR *Pasteurella multocida* EN EL GANADO PORCINO Y BOVINO

PROGRAMA DE DOCTORADO

Programa de Doctorado en Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

X	<p>ESPECIFICAR LA PUBLICACIÓN QUE APORTA COMO INDICIOS DE CALIDAD DE LA TESIS, ESTABLECIDOS EN EL ARTº. 25.a DE LAS ACTUALES NORMAS REGULADORAS DE LOS ESTUDIOS DE DOCTORADO (el Doctorando figurará como primer autor, o segundo si el director es el primero)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Título: "First outbreak of bovine Haemorrhagic Septicaemia caused by <i>Pasteurella multocida</i> type B in Spain" - Autores (p.o. de firma): <i>Inmaculada Cuevas, Alfonso Carbonero, David Cano, Isabel L. Pacheco, Juan C. Marín, Carmen Borge.</i> - Revista (año vol.,pág.): <i>Acta Veterinaria Hungarica. 2020 May 4. doi: 10.1556/004.2020.00014. Online ahead of print.</i> - Base de Datos Internacional o Nacional (caso de CC.JJ., CC.SS. Y Humanidades) en las que está indexada: <i>Journal Citation Report (JCR).</i> - Área temática en la Base de Datos de referencia: <i>VETERINARY SCIENCES</i> - Índice de impacto de la revista en el año de publicación del Artículo: <i>1.059 (2018)</i> - Lugar que ocupa/Nº de revistas del Área temática: <i>66/141</i>
----------	---

	INTERNACIONALIZACIÓN TESIS : PRESENTA LA TESIS CON MENCIÓN INTERNACIONAL Y APORTA CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS NO INCLUIDAS COMO PUBLICACIONES
--	--

SOLICITA :

Sea autorizada la tramitación de la tesis doctoral, una vez que sean constatados los indicios de calidad que se adjuntan a esta solicitud.

Córdoba, a 2 de junio de 2020

Firma del interesado,

Fdo.: MARÍA INMACULADA CUEVAS GÓMEZ

SR/A. COORDINADOR/A DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO



Acta Veterinaria
Hungarica

68 (2020) 1, 8-11

DOI:
10.1556/0041.2020.00014
© 2020 Akadémiai Kiadó, Budapest

ORIGINAL ARTICLE



First outbreak of bovine haemorrhagic septicaemia caused by *Pasteurella multocida* type B in Spain – Short communication

INMACULADA CUEVAS¹, ALFONSO CARBONERO¹,
DAVID CANO¹, ISABEL L. PACHECO², JUAN C. MARÍN^{1,3} and
CARMEN BORGE^{1*}

¹ Department of Animal Health (AGB-149), Campus of International Agri-Food Excellence CITA3, Edificio Sanidad Animal 2ª Planta, Campus Universitario Roburales, University of Córdoba, 14014, Córdoba, Spain

² Department of Pathological Anatomy, Campus of International Agri-Food Excellence CITA3, University of Córdoba, Córdoba, Spain

³ Veterinary Consultant, Hambrant Specialist, Córdoba, Spain

Received: August 14, 2019 • Accepted: January 7, 2020
Published online: May 8, 2020

ABSTRACT

This paper describes the first documented outbreak of haemorrhagic septicaemia (HS) caused by *Pasteurella multocida* type B in cattle in Spain. This acute, highly fatal septicemia causes major economic losses in cattle and buffaloes in many areas of Asia and Africa. In other species and in European countries it is an infrequently reported disease. Acute septicemic pasteurellosis occurred in a free-range farm of 150 cattle and 50 beef calves in Southern Spain. Twenty-one calves and one cow were affected, of which three calves and the adult cow died. Postmortem examination revealed characteristic oedema in the ventral area of the neck and the brisket region, and widespread haemorrhages in all organs. Pure cultures of *P. multocida* were obtained from all tissues and organs studied. The aetiological agent was further confirmed by molecular and biochemical analysis as *P. multocida* capsular type B, biovar 3. Although the source of infection could not be determined, wildlife may play an important role. The use of tetracycline in the initial stage of the disease might be related to the low morbidity and mortality of this outbreak. After using an autogenous vaccine no more cases of HS were observed.

KEYWORDS

outbreak, haemorrhagic septicaemia, *Pasteurella multocida*, capsular type B, septicemic pasteurellosis, bovine

Haemorrhagic septicaemia (HS) is an acute, highly fatal and septicemic disease caused by the capsular types B or E of *Pasteurella multocida* (Shrivastava et al., 2011). This bacteriogenic pathogen is classified into three subspecies (*multocida*, *septica* and *gallinarum*), five capsular types (A, B, D, E and F), 16 somatic serotypes (1–16) and 13 biovars (1–16 and 12–14) (Harper et al., 2006). The age, host species, immunity status, husbandry methods or wildlife-livestock interface can influence the appearance of HS. Young animals are more susceptible and immunosuppression or humid weather conditions can facilitate the appearance of HS outbreaks (De Alveia, 1992; Shrivastava et al., 2011; Soike et al., 2012).

In pigs, sporadic outbreaks of HS have been reported from different continents such as Asia (Verma, 1988; Gamage et al., 1995; Torimaru et al., 1998b) and Europe (Soike et al., 2012; Uçur et al., 2015), including Spain (Carbonero-Torres et al., 2013). In cattle and buffaloes, in contrast, HS is considered an endemic disease in some areas of Asia and Africa, causing high morbidity, mortality and substantial economic losses (De Alveia, 1992). North America and Europe have also reported sporadic cases of HS in cattle and wild ruminants (Enksson et al., 1998; Soike et al., 2012; Uçur et al., 2015; Magyar et al., 2017). However, in Spain this disease has not been reported yet in cattle. This paper describes the first outbreak of bovine HS caused by *P. multocida* type B in Spain.

*Corresponding author: Phone/fax:
+34 (96) 729 8735.
E-mail: carmen.borge@uca.es
ca2@ucombar.es



Capítulo VII

Otras aportaciones científicas

Aportaciones relacionadas con la tesis

Peer-reviewed research papers

- **Cuevas I.**, Carbonero A., Cano D., Pacheco I.L., Marín J.C., Borge C. “First outbreak of bovine haemorrhagic septicaemia caused by *Pasteurella multocida* type B in Spain – Short communication” (2020). Acta Veterinaria Hungárica. DOI: 10.1556/004.2020.00014 (Online ahead of print)
- **Cuevas I.**, Carbonero A., Cano D., García-Bocanegra I., Borge C. “Antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* type B strains associated with acute septicaemic processes in pigs and cattle in Spain” (2020). Accepted for publication in BMC Veterinary Research.

Capítulo de libro

- Borge C., **Cuevas I.**, Arenas A., Carbonero A. “Pasteurellosis. Septicemia hemorrágica bovina” (2019). En Manual Práctico de Enfermedades Infectocontagiosas en Rumiantes (Ed.), Sanidad Animal de la Universidad de Córdoba (pp. 71-82). ISBN: 9788491133537

Abstracts a congresos internacionales

- Borge C., **Cuevas I.**, Rodríguez-Guerra M.A., Carbonero A., Perea A. “Tildipirosin susceptibility of *Pasteurella multocida* Type A, Type B and *Erysipelothrix rhusiopathiae* associated with acute mortality in swine”. 9th European Symposium of Porcine Health Management. 3-5 Mayo 2017. Praga, República Checa.

- **Cuevas I.**, Pacheco I., Marin J.C., Carbonero A., García-Bocanegra I., Borge C.
“Brote de Septicemia Hemorrágica por *Pasteurella multocida* B:3 en una explotación de bovino extensivo” XXI Congreso internacional ANEMBE de Medicina Bovina. 11-13 Mayo 2016. Santiago de Compostela, España.

Abstracts a congresos nacionales

- Ceballos S., Marquez del Cid J.M., **Cuevas I.**, Pérez A., Quesada A., Iglesias R., Borge C. “Determinación de la Resistencia a la colistina en aislados de *Salmonella entérica* procedentes de porcino ibérico y su relación con el plásmido MCR-1” V Congreso de la Asociación Nacional de Veterinarios de Porcino (ANAVEPOR). 23-24 Noviembre 2016. Cordoba, España.

Otras publicaciones derivadas de la actividad investigadora durante el desarrollo de la tesis.

Artículos en revistas de difusión

- Borge C., Torralbo A., **Cuevas I.**, Cano D., García-Bocanegra I., Carbonero A.
“Una mirada al síndrome respiratorio bovino” (2015). Revista Ganadería, 95, 38-40.

Abstracts a congresos internacionales

- Molina L., **Cuevas I.**, Agüera E., Pérez C. “Estudio del resultado práctico de aplicar buenas prácticas en el desmochado de las terneras”. XXIV Congreso International ANEMBE de Medicina Bovina. 22-24 Mayo 2019. Sevilla, España.

- **Cuevas I.**, Borge C., García-Bocanegra I., Sánchez J.M. “Rol del veterinario en la implementación de medidas de manejo, sanidad y bienestar para un uso responsable de antibióticos en el ganado bovino”. XXIV Congreso Internacional ANEMBE de Medicina Bovina. 22-24 Mayo 2019. Sevilla, España.
- **Cuevas I.**, Rodriguez I., Sánchez J.M., Carbonero A., Borge C. “Glositis ulcerativa en dos terneras lactantes”. XXII Congreso Internacional ANEMBE de Medicina bovina. 28-30 Junio 2017. Pamplona, España.
- **Cuevas I.**, Rodriguez I., Sánchez J.M., Borge C. “Gestación gemelar con un feto acardio-amorfo en una vaca primípara”. XXII Congreso Internacional ANEMBE de Medicina bovina. 28-30 Junio 2017. Pamplona, España.
- Martinez- Guijosa J., Lima J.F., Barasona J.A., Acevedo P., Boadella M., Cano D., **Cuevas I.**, García-Bocanegra I., Gortazar C., Vicente J. “Biosecurity at the livestock-wildlife interface: farm characterization and design of a field protocol”. 12th Conference of the European Wildlife Disease Association (EDWA). 27-3 Agosto 2016. Berlin, Alemania.

Abstracts a congresos nacionales

- Cano-Terriza D., Paniagua J., Arenas-Montes A., Jiménez-Ruiz S., Jurado-Tarifa E., **Cuevas-Gómez I.**, Borge C., Carbonero A., García- Bocanegra I. “Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a *Mycobacterium bovis* en ungulados silvestres de Sierra Morena”. I Congreso de Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 12 Febrero 2016. Cordoba, España.

- Martínez J., Vicente J., Lima J.F., Barasona J.A., Boadella M., Cano D., **Cuevas I.**, García-Bocanegra I., Cortázar C., Acevedo P. "Gestión de la interacción entre fauna silvestre y ganado doméstico en el centro-sur español: análisis comparativo de las explotaciones ganaderas". XII Congreso SECEM. 4-7 Diciembre 2015. Burgos, España.
- Caracuel M., **Cuevas I.**, Carbonero A., Cano D., García-Bocanegra I., Arenas A., Borge C. "Identificación mediante PCR de Salmonella Typhimurium y su variante monofásica en cepas aisladas de porcino ibérico". I Congreso Andaluz de Salud Pública Veterinaria. 25-26 Septiembre 2015. Granada, España.

Capítulo VIII

Abreviaturas

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
bp	Base pairs
C	Chloramphenicol
CEF	Ceftiofur
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EMA	European Medicines Agency)
ENR	Enrofloxacin
ERY	Erythromycin
GEN	Gentamicin
HCCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico
HS	Haemorrhagic septicaemia
IHA	Inhibición de la hemaglutinación
IROMP	Iron-regulated Outer Membrane Proteins
LIN	Lincomycin
LPS	Lipopolisacárido
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight
MDR	Multidrug resistant
MIC	Minimum inhibitory concentration
MIC₅₀	MIC that inhibits the growth of 50 per cent of the isolates
MIC₉₀	MIC that inhibits the growth of 90 per cent of the isolates
min	Minuto
NEO	Neomycin
ODC	Ornitina decarboxilasa
OIE	Organización Mundial de la Sanidad Animal
OMP	Outer Membrane Proteins
OXY	Oxytetracycline
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEN	Penicillin
Subsp	Subespecie

TE	Tetracycline
TFA	Ácido trifluoroacético
UE	Unión Europea
WHO	World Health Organization
μl	Microlitro